



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CEPAS DE
HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*: SÍNTESIS
DE GLOEOSPORIOL. DISEÑO Y SÍNTESIS DE
MODELOS DE AGENTES FUNGIESTÁTICOS.**

M^a ENCARNACIÓN FEMENÍA RÍOS
Puerto Real, Julio de 2007



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CEPAS DE
HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*: SÍNTESIS
DE GLOEOSPORIOL. DISEÑO Y SÍNTESIS DE
MODELOS DE AGENTES FUNGIESTÁTICOS.**

Memoria que presenta la Lcda.
D^a. M^a Encarnación Femenía Ríos
para optar al grado de Doctor en
Ciencias Químicas.

Puerto Real, Julio de 2007

D. ISIDRO GONZÁLEZ COLLADO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ, Y **D. ANTONIO JOSÉ MACÍAS SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación, titulado “**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CEPAS DE HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*: SÍNTESIS DE GLOEOSPORIOL. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MODELOS DE AGENTES FUNGIESTÁTICOS**”, constituye la Memoria que presenta D^a. M^a Encarnación Femenía Ríos para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, y ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de esta Universidad bajo nuestra dirección. Ha sido supervisada por ambos y consideramos que reúne los requisitos legales vigentes para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Cádiz, a 24 de Julio de 2007.

Fdo.: D. Isidro González Collado

Fdo.: D. Antonio J. Macías Sánchez

D. ISIDRO GONZÁLEZ COLLADO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación, titulado “**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE CEPAS DE HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*: SÍNTESIS DE GLOEOSPORIOL. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MODELOS DE AGENTES FUNGIESTÁTICOS**”, constituye la Memoria que presenta D^a. M^a Encarnación Femenía Ríos para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, y ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores D. Isidro González Collado y D. Antonio José Macías Sánchez.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Cádiz,
a 24 de Julio de 2007.

Fdo.: D. Isidro González Collado

Para la realización de esta Tesis ha sido indispensable la ayuda de muchas personas, tanto en el trabajo de laboratorio como en la vida diaria, mucho más importante para todo, desde mi punto de vista.

En primer lugar, deseo expresar un sincero agradecimiento a mis Directores de Tesis, Dr. Isidro González Collado y Dr. Antonio José Macías Sánchez; además, a Antonio le debo todo lo que sé. A Charo, que estuvo ahí en los momentos clave de este trabajo y por el proyecto de Colletotrichum. A la Fundación Ramón Areces, por concederme una beca para la realización de esta Tesis Doctoral.

Me siento muy afortunada por haber pasado los 6 últimos años en este grupo de investigación, gracias a él he conocido Moscú y Marrakech, y he pasado 3 meses inolvidables en Inglaterra, experiencias que han cambiado mi vida para siempre. También este periodo de investigación me ha permitido conocer a gente maravillosa: Fini y Rosa, mis dos grandes amigas, la verdad es que no sé que hubiese hecho sin ellas, siempre han estado a mi lado, en los malos y buenos momentos, con paciencia y muchísimo cariño; Jacinto, una de las mejores personas que conozco y un GRAN QUÍMICO (aunque la química lo trata muy mal), nada más por tenerlo como amigo, ya ha merecido la pena; Gabrielilla, mi heredera, nuestra mejicana más cariñosa (a su estilo) y con la “maldad” más divertida; Cristina, “la rubia”, siempre está de buen humor y dispuesta a echarme una mano; las tres formamos el sector femenino del laboratorio, una “pesadilla” para el pobre Jacinto, que ha tenido que soportar todas nuestras conversaciones y cambios hormonales; Dani (“y su ceja”), con todo el misterio que uno pueda imaginar (jeje); Mourad, que dentro de nada será papá; Warley, recién llegado de Brasil, y que ya es todo un botrítico; y mucha gente que ya no está en el grupo, como José Luis, Carlos, Antonio B., Raúl, Yarelis, M^a Elena, Mariana, Alejandra y Mai.

Fuera del grupo de Botrytis también he encontrado muy buenas personas: el primero, Redouan, un gran amigo y el mejor guía para escaparse a Marruecos!!!; David, qué bueno el verano del 2004, eh!; Ana (Vázquez), que empezó siendo alumna colaboradora y ahora es una muy buena amiga mía (nunca olvidaré ese viaje a Portugal!!!); Ana, qué buena gente y qué prudente eres (igualita que yo, jeje)!!!; Gerardo, pura energía, incansable para playa o montaña (esto parece un anuncio, eh); Lydia, que necesitó muy poco tiempo para conquistarnos a todos; nuestro político particular, Villi; Pablo, mi primo

político; Cefe, que siempre está dispuesto a ayudar a todo el mundo; Pepa y Toñi, que se merecen todo lo mejor; Emiliano, que siempre me ha dado muy buenos consejos (con o sin mollete con jamón).

Acompañándome durante este “viaje” siempre han estado mis Padres, de los que estoy MUY MUY orgullosa, que han “aguantado” todos mis cambios de humor (lo que no es fácil). Gracias a ellos estoy aquí. Mi hermana, Elo, yo sí que estoy orgullosa de ella, ¡¡qué niña más linda y más preparada, ojalá me pareciera un poquito más a ella!! Santi, mi “cuñado” favorito, y esas buenas tardes de domingo que hemos pasado todos juntos, que espero se sigan repitiendo. Mi prima Ali, y sus clases de inglés; mi Familia, que me ha apoyado y animado siempre; y mi amiga Aruka, con una llamadita en el momento justo, diciendo lo que necesitaba oír.

Por último, quiero dedicarle este trabajo a Fran, “mi rubio”, “el más guapo entre los guapos”, porque me gusta como me siento a su lado y porque ahora soy MUY MUY FELIZ.

A mis Padres

A Elo

A Fran

INTRODUCCIÓN

I.	Características de las enfermedades fúngicas y su control	5
I.1.	<i>Botrytis</i>: características generales	6
I.2.	<i>Colletotrichum</i>: características generales	11
II.	Tipos de fungicidas más utilizados contra <i>Botrytis</i> y <i>Colletotrichum</i>	17
II.1.	Fungicidas protectores	18
II.1.1.	Ditiocarbamatos y etilenbisditiocarbamatos (EBDCs)	19
II.1.2.	Ftalimidas	21
II.1.3.	Fenoles	22
II.1.4.	Clorobenzenos y compuestos relacionados	23
II.1.5.	Fenilpirroles	23
II.1.6.	Piridinaminas	24
II.1.7.	Otros fungicidas protectores	25
II.2.	Fungicidas sistémicos	28
II.2.1.	Dicarboximidas	29
II.2.2.	Carbamatos: bencimidazoles y carbanilatos	30
II.2.3.	Anilinopirimidinas	32
II.2.4.	Inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBIs)	33
II.2.5.	Compuestos organofosforados	38
II.2.6.	Estrobilurinas	39
II.2.7.	Fungicidas registrados en España para el control de <i>Botrytis</i> y <i>Colletotrichum</i>	40
III.	Tendencias actuales en el desarrollo de nuevos métodos de lucha contra <i>Botrytis</i> y <i>Colletotrichum</i>	41
III.1.	Prácticas de cultivo	42
III.2.	Creación de resistencia en el huésped	43

III.2.1. Resistencia dependiente de genes	44
III.3. Control biológico	46
III.4. Control químico	48
III.4.1. Diseño biosintético de fungicidas	48
III.5. Control integrado	50
IV. Observaciones finales	51

OBJETIVOS

I. Objetivos	55
---------------------	-----------

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

I. Estudio del metabolismo secundario de especies de hongos del género <i>Colletotrichum</i>	61
I.1. Re-estudio del metabolismo secundario de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122. Aislamiento del compuesto (-)-Ia	62
I.2. Estudio del metabolismo secundario de <i>Colletotrichum acutatum</i> 364856	67
I.2.1. (-)-Isosclerona (IX)	72
I.2.2. Tirosol (X)	73
I.2.3. Alcohol 4-hidroxibencílico (XI)	73
I.2.4. (+)-3-hidroxiisosclerona (XII)	74
II. Síntesis de (±)-gloeosporiol ((±)-I)	76
II.1. Aproximación utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (1) como material de partida	76
II.1.1. Síntesis del sistema de anillos	76
II.1.2. Funcionalización del anillo de dihidrofurano	81

II.1.3.	Ensayos de desprotección del grupo metilendioxi	82
II.2.	Síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3,4-dihidroxibenzaldehído (8) como material de partida	85
II.2.1.	Síntesis del sistema de anillos	85
II.2.2.	Funcionalización del anillo de dihidrofurano	88
II.2.3.	Obtención de (±)-gloeosporiol y su derivado acetilado	90
II.3.	Resolución de (±)-gloeosporiol	93
III.	Aproximación a la síntesis enantioselectiva de (-)-(2S,3S,4R)-gloeosporiol ((-)-I). Determinación de la estereoquímica absoluta de (-)-I	97
III.1.	Resolución cinética enzimática	97
III.1.1.	Resolución cinética mediante acetilación enzimática	101
III.1.2.	Resolución cinética mediante hidrólisis enzimática	103
III.2.	Resolución cinética via dihidroxilación asimétrica de Sharpless	108
III.3.	Síntesis de (-)-(2S,3S,4R)-gloeosporiol ((-)-I)	111
IV.	Nuevos modelos de fungicidas. Síntesis de aminoalcoholes mediante apertura regioselectiva de (±)-óxido de estireno con aminas, catalizada por triflato de estaño (II)	113
V.	Ensayos de actividad fungiestática	124
V.1.	Ensayos de actividad fungiestática sobre <i>Botrytis cinerea</i> 2100	125
V.2.	Ensayos de actividad fungiestática sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122	130
VI.	Evaluación de la actividad antioxidante. Actividad atrapadora de radicales libres	134

PARTE EXPERIMENTAL

I.	Materiales y métodos	143
I.1.	Técnicas instrumentales	143
I.2.	Técnicas cromatográficas	146
I.3.	Técnicas microbiológicas	148
I.4.	Ensayos de actividad fungiestática mediante la técnica de envenenamiento del medio contra <i>Botrytis cinerea</i> 2100 y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122	149
I.5.	Ensayos de actividad fitotóxica	151
I.6.	Evaluación de la actividad antioxidante. Actividad atrapadora de radicales libres	151
II.	Aislamiento de metabolitos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122. Aislamiento de ((-)-(2 <i>S</i> (<i>R</i>),3 <i>S</i> (<i>R</i>),4 <i>R</i> (<i>S</i>))-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((-)-Ia)	154
II.1.	((-)-(2 <i>S</i> (<i>R</i>),3 <i>S</i> (<i>R</i>),4 <i>R</i> (<i>S</i>))-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((-)-Ia)	155
III.	Aislamiento de metabolitos de <i>Colletotrichum acutatum</i> 364856	156
III.1.	Caracterización de los metabolitos obtenidos de <i>Colletotrichum acutatum</i> 364856	161
III.1.1.	((-)-Isosclerona (IX)	161
III.1.2.	Tirosol (X)	162
III.1.3.	Alcohol 4-hidroxibencílico (XI)	162
III.1.4.	3-hidroxiisosclerona (XII)	163
IV.	Síntesis de (±)-gloeosporiol ((±)-I)	164

IV.1. Aproximación utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (1)	
como material de partida	164
IV.1.1. Preparación de la 3',4'-(metilendioxi)fenil vinil cetona (2)	164
IV.1.2. Preparación de (±)-1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-en-1-ol ((±)-3)	165
IV.1.3. Preparación de (±)-1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-enil alil éter ((±)-4)	166
IV.1.4. Preparación de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano ((±)-5)	167
IV.1.5. Preparación de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahydrofurano-3,4-diol ((±)-6)	168
IV.2. Síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3,4-dihidroxibenzaldehído (8) como material de partida	170
IV.2.1. Preparación de 3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)-benzaldehído (9)	170
IV.2.2. Preparación de (±)-1-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-prop-2-en-1-ol ((±)-10)	171
IV.2.3. Preparación de (±)-1-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-prop-2-enil alil éter ((±)-11)	172
IV.2.4. Preparación de (±)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-2,5-dihidrofurano ((±)-12)	173
IV.2.5. Preparación de (±)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-tetrahydrofurano-3,4-diol ((±)-13)	174
IV.2.6. Preparación de (±)-gloeosporiol ((±)-I)	176
IV.2.7. Preparación de 2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((±)-Ia)	177
IV.3. Resolución de (±)-gloeosporiol ((±)-I)	179
IV.3.1. Esterificación con (R)-(-)-α-MPA del diol ((±)-13b)	179
IV.3.2. Preparación de (2R,3R,4S)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((+)-13b)	181

IV.3.3.	Preparación de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)-fenil)]-tetrahydrofurano-3,4-diol ((-)- 13b)	181
IV.3.4.	Preparación de (+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-gloeosporiol ((+)- I)	182
IV.3.5.	Preparación de (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-gloeosporiol ((-)- I)	182
IV.3.6.	Preparación de (+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((+)- 1a)	183
IV.3.7.	Preparación de (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((-)- 1a)	183

V. Aproximación a la síntesis enantioselectiva de (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-gloeosporiol ((-)-**I**). Determinación de la estereoquímica absoluta de (-)-**I** 185

V.1. Resolución cinética enzimática 185

V.1.1.	Preparación de acetato de (±)-1-[3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)-fenil]-3-metil-but-2-enilo ((±)- 10a)	185
V.1.2.	Resolución enzimática mediante el uso de lipasas	186

V.2. Resolución cinética vía dihidroxilación asimétrica de Sharpless 189

V.2.1.	Tratamiento de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihydrofurano ((±)- 5) con ADMix α	189
V.2.2.	Tratamiento de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihydrofurano ((±)- 5) con ADMix β	190
V.2.3.	Preparación del diacetato de (±)-(2 <i>S</i> (<i>R</i>),3 <i>R</i> (<i>S</i>),4 <i>S</i> (<i>R</i>))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahydrofurano-3,4-diílo ((±)- 7a)	191
V.2.4.	Preparación del diacetato de (±)-(2 <i>S</i> (<i>R</i>),3 <i>S</i> (<i>R</i>),4 <i>R</i> (<i>S</i>))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahydrofurano-3,4-diílo ((±)- 7b)	192
V.2.5.	Tratamiento de (±)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-2,5-dihydrofurano ((±)- 12) con ADMix α	192

V.3. Preparación de (-)-gloeosporiol ((-)-**I**) 194

V.3.1.	Preparación de (+)-1-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-prop-2-enil alil éter ((+)- 11)	194
V.3.2.	Preparación de (+)-(<i>R</i>)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-2,5-dihydrofurano ((+)- 12)	194

V.3.3.	Preparación de (-)-(2S,3S,4R)-2-[(3',4'-bis-(terc-butildimetilsilanilo)-fenil)]tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)- 13b)	195
V.3.4.	Preparación de (-)-(2S,3S,4R)-gloeosporiol ((-)- I)	196

VI. Nuevos modelos de fungicidas. Síntesis de aminoalcoholes mediante apertura regioselectiva de (±)-óxido de estireno con aminas, catalizada por triflato de estaño (II) 197

VI.1.	Procedimiento típico	197
VI.1.1.	(±)-2-(fenilamina)-2-feniletanol (18a)	198
VI.1.2.	(±)-2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (18b)	199
VI.1.3.	(±)-2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18c)	199
VI.1.4.	(±)-2-(3'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18d)	200
VI.1.5.	(±)-2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18e)	201
VI.1.6.	(±)-2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18f)	201
VI.1.7.	(±)-2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18g)	202
VI.1.8.	(±)-2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18h)	203
VI.1.9.	(±)-4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18i)	203
VI.1.10.	(±)-2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18j)	204
VI.1.11.	(±)-3-metoxicarbonil-5-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18k)	205
VI.1.12.	(±)-4-metoxicarbonil-2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18l)	205
VI.1.13.	(±)-2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (18m)	206
VI.1.14.	(±)-2-(bencilfenilamino)-2-feniletanol (18n)	207
VI.1.15.	(±)-2-butilamino-2-feniletanol (18o)	207
VI.1.16.	(±)-2-diisopropilamino-2-feniletanol (18p)	208
VI.1.17.	(±)-2-diisopropilamino-1-feniletanol (19p)	208
VI.1.18.	(±)-2-bencilamino-2-feniletanol (18r)	209
VI.1.19.	(±)-2-bencilamino-1-feniletanol (19r)	209

VII. Ensayos de actividad fungiestática sobre *Botrytis cinerea* 2100 211

VIII. Ensayos de actividad fungiestática sobre *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 222

IX. Evaluación de la actividad antioxidante. Actividad atrapadora de radicales libres	233
---	-----

CONCLUSIONES

I. Conclusiones	239
-----------------	-----

ANEXOS

I. Anexo I:

Fungicidas registrados en España para el control de <i>Botrytis</i> y <i>Colletotrichum</i>	245
---	-----

II. Anexo II:

Anexo de espectros	253
--------------------	-----

Relación de abreviaturas

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

Ae	Acetato de etilo
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
CH₃CN	Acetonitrilo
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
gCOSY	Gradient Correlation Spectroscopy
δ	Desplazamiento
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
Et₂O	Éter etílico
EtOH	Etanol
He	Hexano
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
H₂O	Agua
HPLC	High performance liquid chromatography
gHSQC	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Espectroscopía infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KOH	Potasa
LDA	Diisopropilamiduro de litio
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Relación masa/carga

Mol. sieves	Molecular sieves
NaCl	Cloruro sódico
Na₂SO₄	Sulfato sódico
n.O.e.	Nuclear Overhauser effect
OsO₄	Tetróxido de osmio
Rto.	Rendimiento
R.M.N. de ¹H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
R.M.N. de ¹³C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
TBDMSCI	Cloruro de <i>terc</i> -butildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
UV	Espectroscopía ultravioleta

Introducción

El control racional de las enfermedades producidas por hongos sobre cultivos comerciales es uno de los mayores problemas con los que se encuentra la industria alimentaria. La diversidad de especies de hongos, su gran adaptabilidad a condiciones extremas y su capacidad para desarrollar resistencia a los fungicidas hacen de estas enfermedades unas de las más temidas por los agricultores.

Con la llegada de los insecticidas de síntesis en la década de los cincuenta, y, posteriormente, de los fungicidas, se alcanzó un control eficiente de un gran número de plagas. Este hecho supuso una importante revolución técnica desde el punto de vista del control de las enfermedades en las cosechas y cultivos comerciales.

Esta mejora en las condiciones sanitarias de los cultivos ha sido uno de los factores que ha permitido un crecimiento en la producción de cereales, frutas y hortalizas, con una repercusión importantísima en la alimentación humana, desde el punto de vista de la producción total y de la sanidad en los alimentos consumidos.

La aplicación de productos químicos de síntesis es el sistema más utilizado para el control de las podredumbres fúngicas. Sin embargo, la gran capacidad de adaptación de los patógenos a los plaguicidas de síntesis, la persistencia de estos compuestos en el suelo durante largos periodos de tiempo y la incorporación de estos a la cadena alimentaria, están haciendo disminuir la confianza en la utilización de pesticidas de síntesis tradicionales y están motivando la aparición de nuevas técnicas y métodos de control compatibles con el entorno ambiental.

Además, cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitarias que los fungicidas de síntesis plantean, ya que estos se presentan como agentes oncogénicos potenciales cuando son aplicados en frutas y verduras. La preocupación por sus posibles efectos nocivos en la fruta adquiere especial importancia si tenemos en cuenta que ésta suele ser consumida en fresco y la proximidad temporal entre la aplicación de los tratamientos y su consumo. Debido al grave problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes Estados, y en especial los más desarrollados, han establecido una serie de límites máximos de residuos (LMR) bastante restrictivos, en muchos casos por debajo de los recomendados por el Codex Alimentarius (FAO/OMS).¹

La existencia de diferencias entre los Estados miembros de la UE con respecto a los contenidos máximos permitidos de estos residuos representa en algunos casos una barrera para el comercio, y en especial para las exportaciones de frutas al resto de los países de la UE. Para eliminar estos obstáculos y favorecer la libre circulación de mercancías, el consejo de la UE, en la directriz 76/895/CEE y la modificada en la 89/186/CEE, intenta uniformizar las legislaciones de los diferentes Estados, objetivo que no se ha conseguido todavía, ya que quedan por regular la mayoría de los plaguicidas. La aparición de cepas patogénicas resistentes, con el consiguiente incremento de las dosis de fungicidas, aumenta el coste de la conservación y el nivel de pérdidas por podredumbres y supone una dificultad añadida para la exportación de estos productos agrarios.¹

¹ Viñas, I.; Teixidó, N.; Abadías, M.; Torres, R. y Usall, J. "Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas". *Simposio poscosecha 2006*, Orihuela, pp. 363-373.

Dentro del control químico de las enfermedades fúngicas ocupan un lugar destacado las aproximaciones racionales al diseño de fungicidas,² entre las cuales destaca el diseño biosintético, que permite obtener productos químicos selectivos, no persistentes y que no se incorporan a la cadena alimentaria, y que son, por tanto, respetuosos con el medio ambiente.

Dado el amplio número de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos comerciales, en este estudio nos centraremos fundamentalmente en los del género *Botrytis* y *Colletotrichum*. Especies de ambos géneros se encuentran entre los agentes fitopatógenos más agresivos, produciendo elevadas pérdidas, tanto en las cosechas como en los productos almacenados.

I. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS Y SU CONTROL.

Aunque los hongos comparten algunas características con los animales y las plantas, son filogenéticamente diferentes. Los hongos son organismos eucariotas y poseen paredes celulares, como las plantas, sin embargo son heterótrofos, es decir, son incapaces de fijar carbono a través de la fotosíntesis. A diferencia de los animales, que ingieren el alimento, los hongos lo absorben, y sus células tienen pared celular. Debido a estas razones, estos organismos están situados en su propio Reino biológico, el Reino *Fungi*.

Aunque las características de las enfermedades fúngicas pueden ser muy diversas dependiendo del patógeno, todas tienen en común la dificultad en el control de las mismas. Esto es debido, principalmente, a la gran adaptabilidad del hongo, pudiendo atacar cualquier parte de la planta y en casi cualquier estado de crecimiento, incluso durante el almacenamiento a baja temperatura.

Los hongos son extremadamente sensibles a las condiciones medioambientales y exhiben una alta capacidad de adaptación y de colonización de diferentes nichos

² Magnus, W. W. "Structure-based design of agrochemicals". *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 278-291.

ecológicos. Se pueden encontrar tanto en las montañas como en las profundidades abisales, desde las secas y frías regiones polares a los húmedos y templados trópicos.

Debido a la ausencia de clorofila, un importante número de hongos fitopatógenos tienen la posibilidad de alternar periodos de vida saprófita con otros de comportamiento parasitario o semiparasitario, dependiendo de las condiciones climáticas y de la disponibilidad de sustrato. Además pueden presentar reproducción sexual y asexual, mostrando diversos estados y formas de latencia, pudiendo permanecer en el suelo o sobre restos de plantas durante largos periodos de tiempo.

El inicio y el mantenimiento de una infección producida por hongos dependen de una compleja secuencia e interacción de sucesos biológicos, tales como la producción, la dispersión, la patogenicidad y la capacidad de supervivencia de los inóculos. Cada evento está predispuesto y determinado por conjuntos de factores ambientales y agrícolas, como temperatura, lluvia, humedad, protección de la cosecha y nutrición.

Que la enfermedad se traduzca en lesiones agresivas, no agresivas o en latencia viene determinado por los mecanismos de resistencia del huésped, la edad fisiológica de los tejidos infectados, la disponibilidad y contenido tanto de nutrientes como de agua del suelo y de los tejidos, además de otros factores relacionados con el clima y el tipo de cultivo.

Algunas prácticas de cultivo, como la irrigación, la aplicación de fertilizantes y de fungicidas pueden, potencialmente, predisponer hacia la enfermedad. Al igual que existen factores conocidos que predisponen las cosechas hacia la patogénesis, hay otros que permiten a las plantas evitar la infección y sus consecuencias.

Por lo tanto, el control de una epidemia puede sólo realizarse mediante la integración de una amplia variedad de prácticas racionales de gestión de las cosechas.

I.1. *Botrytis*: características generales.

Las especies de *Botrytis* constituyen uno de los grupos de patógenos de plantas y saprófitos más extendido geográficamente. Se encuentran allá dondequiera que crezcan cosechas huésped, desde zonas frías como Alaska o Canadá, hasta áreas subtropicales como Egipto, ocasionando importantes pérdidas en los cultivos comerciales.

Son muchas las especies pertenecientes a este género, pudiéndose destacar las siguientes:

- *B. cinerea*: patógeno de uvas, lechugas, tomates, tabaco y fresas, entre un total de más de 235 especies de plantas (*figura I.1*).
- *B. squamosa*: patógeno de cebollas, que ocasiona la rotura del tallo.
- *B. allii* y *B. byssoidea*: patógenos de cebollas.
- *B. fabae*: patógeno de judías, causante de puntos epidémicos en las hojas.
- *B. tulipae*: patógeno responsable de quemaduras en tulipanes y azafrán.
- *B. gladioli*: patógeno de gladiolos y lirios.

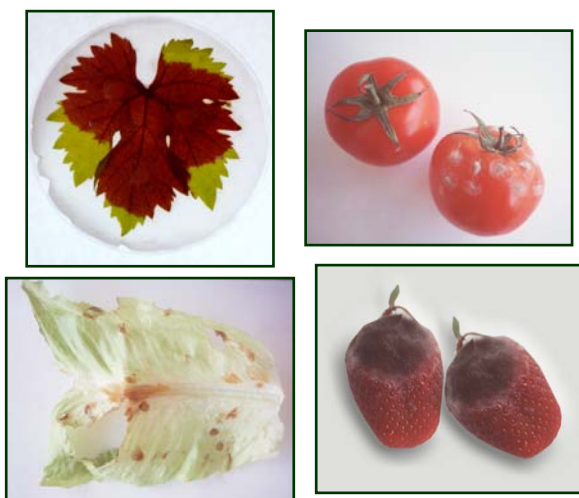


Figura I.1. Efecto producido por *Botrytis cinerea* en diferentes cultivos.

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* es el agente causante de la enfermedad conocida como "podredumbre gris", cuyo nombre se debe a que produce un moho gris pulverulento sobre los cultivos que infecta (*figura I.2*).³

³ a) Torras, M. A. C. "Aspectos actuales de la taxonomía de hongos imperfectos". *VII Congreso Nacional de Microbiología* **1979**, 240-243; b) Coley-Smith, J. R.; Verhoeff, K. and Jarvis W. R. "The Biology of *Botrytis*". AcademicPress, London. **1980**.

La podredumbre gris es la enfermedad más extendida y económicamente más importante de las que afectan a un amplio número de frutas y hortalizas, especialmente las uvas, reduciendo su calidad y cantidad.⁴ Los vinos producidos por uvas infectadas tienen menor calidad debido a la disminución de monosacáridos (glucosa, fructosa) y a la acumulación de metabolitos (glicerol, ácido glucónico) y de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos. Estos vinos tampoco son recomendables para envejecer, ya que son susceptibles a la oxidación y a la contaminación bacteriana.⁵



Figura I.2. “Podredumbre gris” causada por *Botrytis cinerea* en un racimo de uvas.

Aunque *B. cinerea* causa severos daños en la producción de vinos (podredumbre gris), también, bajo ciertas circunstancias, puede dar vinos de excelente calidad (“podredumbre noble”), tales como el Sauternes (Francia), Tokays (Hungría) y Trockenbeerenauslesen (Alemania, Austria).⁵ El beneficio radica en que se consumen proporcionalmente mucho más los ácidos que los azúcares, obteniéndose vinos suaves, dulces, con cuerpo y agradable bouquet.

La importancia de las infecciones producidas por el hongo *B. cinerea* requiere el empleo intensivo de fungicidas. Las pérdidas económicas ocasionadas por este

⁴ Snowdon, A.L. “A colour Atlas of Post Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables”. Wolfe Scientific, London. **1990**.

⁵ Bulit, J., Dubos, B. “Compendium of Grape Diseases”. APS Press, St. Paul, Minnesota. **1988**.

fitopatígeno se estiman en 100 millones de euros. Por ello, el control racional de la enfermedad producida por *B. cinerea* es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la industria agroalimentaria. Su gran adaptabilidad a condiciones extremas y su capacidad para desarrollar resistencia a los fungicidas⁶ hacen de *B. cinerea* uno de los hongos más temidos por los agricultores.

Botrytis cinerea es un parásito que, de forma inicial, se establece en las zonas más debilitadas y dañadas de la planta huésped para posteriormente extenderse al resto de la planta, aunque en algunos casos puede atacar plantas infectadas por otro tipo de plagas o patógenos. La infección por *B. cinerea* tiene lugar mediante anclaje (apresorio) de los llamados tubos germinativos (ramificación de hifas) sobre el tejido a infectar. El proceso de invasión va acompañado de la secreción de sustancias que son las encargadas de destruir el tejido vegetal de la planta huésped. Las infecciones por *Botrytis* conllevan de forma característica la aparición de lesiones necróticas y pudrición, en las cuales es importante la secreción de diversos tipos de sustancias:

- Enzimas degradantes de la pared celular (poligalacturonasas, pectinaliasas, celulasas)⁷ o de la membrana celular (fosfolipasas, lipasas).⁸
- Especies activas de oxígeno (AOS).⁹
- Toxinas.^{10,11}

⁶ a) Copping, L. G.; Hewitt, H. G. "Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents". The Royal Society of Chemistry. **1998**, 74-114; b) Locke, D.; Hollomon, D.; Jones, D.; O'Neil, T. "Fungicide Resistance", en nombre del grupo británico "The Fungicide Resistance Action Group-UK (www.pesticides.gov.uk)" publicado en Agosto de **2001**; c) Website del comité "Fungicide Resistance Action Committee" <http://www.frac.info/frac.html>.

⁷ Prins, T W.; Tudzynski, P.; Von Tiedemann, A.; Tudzynski, B.; Have, A.; Hansen, M. E.; Tenberge, K.; Van Kan J. A. L. "Infection Strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens". In *Fungal Pathology J.* Kronstad, ed.: Kluwer Academic Publishers **2000**, 123-145.

⁸ Shephard, D. V. and Pitt, D. "Purification of a phospholipase from *Botrytis* and its effects on plant tissues". *Phytochemistry* **1976**, 15, 1465-1470.

⁹ a) Tiedemann, von A. "Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*". *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1997**, 50, 151-166. b) Govrin, E. M. and Levine, A. "The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*". *Curr. Biol.* **2000**, 10, 751-757. c) Deighton, N.; Muckenschnabel, I.; Goodman, B. A. and Williamson, B. "Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*". *Plant Journal* **1999**, 20, 485-492.

Cabe destacar la importancia de las enzimas en el proceso de infección. Las enzimas pécticas juegan un papel fundamental en la degradación de tejidos al facilitar el acceso de otras enzimas⁷ y, por otra parte, las enzimas degradantes de la pared celular, que alteran la presión osmótica causando la muerte celular.⁸

Estudios recientes han revelado aspectos completamente novedosos acerca de los mecanismos que utilizan los hongos necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, para atacar e invadir la planta huésped. Estos estudios presentan evidencias de la generación por parte del fitopatógeno de las llamadas especies activas de oxígeno durante el proceso de infección. Estas especies son producidas tanto por el hongo como por el huésped, cuando las paredes celulares son degradadas, estimulando la propagación de una serie de reacciones de radicales libres.⁹ También se ha demostrado que en los tejidos de la planta a menudo se produce etileno como respuesta al ataque del patógeno.¹²

En cuanto a las toxinas secretadas por el hongo durante la infección, cabe mencionar, además de la aparición de polisacáridos, tanto de alto peso molecular (unidades de glucosa) como de bajo peso molecular (unidades de manosa, galactosa, glucosa y ramnosa), y de ácidos orgánicos, la de una serie de metabolitos secundarios, de naturaleza sesquiterpénica, excretados por el hongo en el desarrollo de las lesiones necróticas sobre la planta.¹³

¹⁰ Verhoeff, K.; Leeman, M.; Van Peer, R.; Póstuma, L.; Schot, N. and Van Eijk, G. W. "Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*". *J. Phytopathology* **1988**, 122, 327-336.

¹¹ Collado, I. G.; Aleu, J.; Hernández-Galán, R. and Durán-Patrón, R. "*Botrytis* species: an intriguing source of metabolites with a wide range of biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species". *Current Organic Chemistry* **2000**, 4, 1261-1286.

¹² Elad, Y. "Modern Fungicides and Antifungal Compounds". Intercept Ltd. Andover, Hampshire. **1995**, 217-233.

¹³ a) Deighton, N.; Muckenschnabel, I.; Colmenares, A. J.; Collado, I. G. and Williamson, B. "Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*". *Phytochemistry* **2001**, 57, 689-692. b) Rebordinos, L.; Cantoral, J. M.; Prieto, M. V.; Hanson, J. R. and Collado, I. G. "The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*". *Phytochemistry* **1996**, 42, 383-387. c) Colmenares A. J.; Aleu, J.; Durán-Patrón, R.; Collado, I. G. and Hernández-Galán, R. "The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*". *Journal of Chemical Ecology* **2002**, 28, 989-997. d) Colmenares A. J. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. **2001**.

I.2. *Colletotrichum*: características generales.

Las especies de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Colletotrichum* presentan una amplia distribución en todos los continentes. Los agrónomos y los fitopatólogos lo consideran como uno de los patógenos más importantes en la agricultura, debido a la diversidad de especies vegetales que pueden ser afectadas y la magnitud de los daños ocasionados sobre las plantas.^{14,15,16}

Entre las especies más agresivas pertenecientes a este género, se pueden destacar las siguientes:^{16,17}

- *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz. (teleomorfo: *Glomerella cingulata* [Stoneman] Spauld. & H. Schrenk): patógeno de una amplia variedad de frutas, tales como manzanas, aguacates, cítricos, papayas, melocotones, mangos y fresas.
- *C. acutatum*: patógeno de almendras, aguacates, mangos, melocotones, cítricos, uvas y fresas.
- *C. coccodes*: patógeno de pimientos, patatas y tomates.
- Otras especies con múltiples huéspedes son *C. lindemuthianum*, *C. capsici*, *C. dematium*, *C. graminicola* y *C. truncatum*.

Desde el punto de vista económico, estos hongos causan elevadas pérdidas al sector agrícola de todo el mundo. La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en las áreas tropicales y subtropicales del planeta, debido a las condiciones ambientales de estas regiones, con temperaturas que van desde medias a altas, lluvias frecuentes y una

¹⁴ Waller, J. M. "Colletotrichum diseases of perennial and other cash crops". In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. 1992. CAB International, Wallingford, UK. pp. 167-185.

¹⁵ Lenné, J. N. "Colletotrichum diseases of legumes". In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. 1992. CAB International, Wallingford, UK. pp. 134-166.

¹⁶ Bailey, J. A.; O'Connel, R. J.; Pring, R. J. and Nash, C. "Infection strategies of *Colletotrichum* species". In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. 1992. CAB International, Wallingford, UK. pp. 88-120.

¹⁷ Freeman, S. "Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits". In Prusky, D.; Freeman, S. and Dickman, M. B. [Eds.] *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. 2000 APS Press, St. Paul, Minnesota; y referencias incluidas.

humedad relativa significativa, que favorecen la dispersión y el desarrollo del patógeno.^{18,19,20}

En general, *Colletotrichum* puede atacar todas las partes de las plantas. Las más afectadas son las aéreas (tallos, brotes tiernos, inflorescencias, frutos en formación y en estados avanzados de desarrollo), pero también se han observado ataques en los cuellos de los tallos y en las raíces, aunque son poco frecuentes en algunas especies vegetales.²¹ La enfermedad se presenta en todos los estados de crecimiento, desde la germinación de las semillas hasta las plantas adultas, y abarca especies perennes y anuales de monocotiledóneas y dicotiledóneas.^{14,15,18-20}

La enfermedad causada por las diferentes especies del género *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) se conoce comúnmente como antracnosis, y se manifiesta por la aparición de manchas oscuras en hojas y frutos, con formas redondeadas u ovaladas, con tamaños variables que pueden oscilar entre un diámetro de 1 ó 2 mm hasta 5 cm; en algunas ocasiones, las lesiones se presentan ligeramente sumidas o poseen un contorno levemente elevado (*figura 1.3*).²⁰

¹⁸ Tarr, A. J. "Diseases of sorghum, Sudan grass and Broomcorn". Commonwealth Mycological Institute, **1962**. Kew, London, pp. 380.

¹⁹ Pastor-Corrales, M. A. and Frederiksen, R. A. "Sorghum Anthracnose". In Williams, R. J.; Frederiksen, R. A. and Mughogho, L. K., eds. **1980**, Sorghum diseases: A World Review. Proceedings of the International Workshop on Sorghum diseases. ICRISAT, Patancheru, India, pp. 289-294.

²⁰ Agrios, G. N. *Fitopatología* **1991**, Versión Española. Guzmán, Ortiz, M. 4ª ed. Editorial Limusa, Noriega Editores, pp. 530.

²¹ Frederiksen, R. A. Anthracnose stalk rot. In Sorghum root and stalk rots, a critical review. 1984. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases. 27 Nov.-2 Dec. **1983**. Bellagio, Italy. ICRISAT, Patancheru, AP 502324, India, pp. 34-42.



Figura 1.3. Aspecto de las lesiones causadas por antracnosis en distintos tipos de frutos (tomates, sandía, naranjas, manzana y fresa).

En general, las lesiones producidas por la antracnosis se presentan con tonalidades negras o marrones; en otras ocasiones, las infecciones aparecen con coloraciones que van del rojo ladrillo al púrpura, y posteriormente cambian hacia coloraciones pardas oscuras, hasta adquirir tonalidades muy negras. El nombre de antracnosis hace alusión al aspecto visual de las manchas.²⁰

Es muy común observar en los centros de las lesiones más antiguas algunas masas de esporas de color rosa o rojo. Las esporas se localizan en acérvulos que se distribuyen en formaciones concéntricas simulando anillos bien diferenciados; estas agrupaciones de cuerpos reproductivos son muy notorias en las épocas de alta humedad y constituyen la fuente principal de los inóculos de la enfermedad.²⁰

En épocas lluviosas, los inóculos del patógeno se dispersan a través de los cultivos con las gotas de agua, y en las épocas secas, con el viento; estos dos medios de

dispersión son considerados como los más importantes por los fitopatólogos. Los insectos, las aves, los pequeños mamíferos, las herramientas utilizadas en las labores agrícolas y la circulación de personas en el interior de los cultivos, se consideran propagadores secundarios de la enfermedad.²² Las partes afectadas de las plantas en muchas ocasiones se momifican, actuando como fuente de inóculos, ya que el parásito sobrevive en ellas como saprófito.²⁰

En algunos vegetales, la enfermedad produce una disminución significativa del área foliar, que conlleva un debilitamiento de las plantas por reducción de la capacidad fotosintética. Los ataques a las inflorescencias y a los frutos en formación ocasionan su caída prematura, lo que conduce a una disminución de la productividad;^{2,22} los brotes tiernos y los tallos en formación de las plantas adultas y jóvenes son afectados drásticamente. El ataque ocasiona, en muchos casos, la muerte del huésped; este hecho es muy importante en los viveros, donde se presentan pérdidas significativas de las plántulas destinadas al trasplante.²⁰

Los efectos de la enfermedad se ven incrementados por la tendencia del patógeno a causar daños en los frutos durante los procesos de poscosecha;²³ este estadio de la enfermedad afecta en gran medida a todos los frutos destinados a la exportación y aquéllos que son almacenados para su posterior comercialización o consumo. Esta forma de ataque a los vegetales es ocasionado por el fenómeno de quiescencia o enfermedad latente, característica del género *Colletotrichum*, y que comparte con otros géneros de hongos fitopatógenos.¹⁹⁻²²

Para todas las especies del género, el periodo de latencia puede durar mucho tiempo (en ocasiones, gran parte del desarrollo del fruto), en este lapso de tiempo no se observan los síntomas típicos de la enfermedad; las primeras lesiones sólo se manifiestan cuando en los frutos comienza el proceso de maduración. Las

²² Dodd, J. C.; Estrada, A. and Jeger, M. J. "Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics". In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. **1992**. CAB International, Wallingford, UK. pp. 308-325.

²³ Prusky, D. and Plumbey, R. A. "Quiescent Infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits". In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. **1992**. CAB International, Wallingford, UK. pp. 289-307.

investigaciones realizadas sobre esta etapa indican que el desarrollo del patógeno se dispara con los cambios metabólicos que ocurren durante el periodo de maduración.^{19-21,23}

En el campo, el hongo puede permanecer en ausencia de sus huéspedes sobreviviendo como saprófito en los restos de las cosechas. Su actividad como patógeno se reinicia con el establecimiento de los nuevos cultivos, atacando a las plántulas poco después de su germinación. En las plantas perennes, la enfermedad comienza de nuevo con la aparición de las inflorescencias, los brotes y el nuevo follaje. En este tipo de plantas, el patógeno permanece viable sobre las grietas de las cortezas envejecidas, las hojas maduras o secas que fueron atacadas por el mismo, en los frutos y otras partes de las plantas que han muerto por ataques anteriores y se han momificado permaneciendo adheridas a la planta.²⁰

En el ataque por parte de los hongos fitopatógenos a los vegetales se ha observado que las plantas despliegan estrategias físicas y químicas orientadas hacia la defensa,^{24,25,26} y sólo aquellos patógenos que pueden vencer estas barreras logran tener éxito en sus ataques. Gran parte del repertorio de ataque desplegado por los hongos es fitoquímico y está constituido por enzimas y otros compuestos de estructuras moleculares menos complejas, que son capaces de bloquear o romper las defensas exhibidas por las plantas.

Los fitopatólogos consideran a la especie *C. gloeosporioides* como uno de los hongos que tienen mayor éxito en su estrategia de ataque a los vegetales; esto se sustenta por las observaciones realizadas sobre el desarrollo de la enfermedad y las respuestas defensivas por parte del huésped, ya que, en la mayoría de los casos, la producción de fitoalexinas por parte de las variedades de plantas resistentes es tardía y sólo se presenta cuando la infección ha avanzado significativamente y el hongo ha

²⁴ Harborne, J. B. "Recent advances in chemical ecology". *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 509-523.

²⁵ Harborne, J. B. "Twenty-five years of chemical ecology". *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 361-379.

²⁶ Harborne, J. B. "Higher plant-lower plant interactions: phytoalexins and phytotoxins" In *Introduction to ecological chemistry* (Harborne, J. B.) 4th ed. 264-297. Academic Press, London, **1993**.

invadido las células casi en su totalidad. Esto hace pensar que el repertorio químico empleado por el hongo es muy efectivo y pasa desapercibido por las plantas.

La situación taxonómica del género *Colletotrichum*, al igual que la de muchos otros patógenos, ha permanecido imprecisa durante muchos años. Está totalmente admitido que el método tradicional de caracterización de especies basándose en aspectos morfológicos no es apropiado para esta problemática. Actualmente se están llevando a cabo muchos estudios con técnicas moleculares con el fin de desarrollar exámenes de diagnóstico rápido para las especies de *Colletotrichum*, especialmente aquellas relacionadas con enfermedades de la fresa.^{27,28} Esto es de particular importancia no sólo por la deficiente clasificación taxonómica, sino porque deben existir diferencias significativas en el modo de agresión de los distintos patógenos. Por otro lado, algunas especies del género *Colletotrichum* están implicadas en problemas legales. Así, la presencia de *C. acutatum* en productos sujetos a exportación, está sometida a controles estrictos y requerimientos de garantías por parte de la Unión Europea (EC 77/93), que ha desarrollado un programa para un diagnóstico rápido y fiable de estas especies de *Colletotrichum* asociadas a la fresa.^{2,27} Un prerrequisito esencial que se debe cumplir en el desarrollo de herramientas de diagnóstico es que se utilice un método fiable de identificación. En este contexto, la caracterización de metabolitos secundarios aislados de diferentes especies puede ayudar a la identificación de las mismas, además de clarificar el papel que juegan en el mecanismo de infección. Este último punto ha constituido el centro de numerosos estudios en la bibliografía más reciente.

Se ha publicado un número destacado de trabajos sobre aislamiento y caracterización de metabolitos biosintetizados por especies del género *Colletotrichum*,

²⁷ García-Muñoz, J. A.; Suárez, M. B.; Grondona, I.; Montes, E.; Buddie, A. G., Bridge, P. D. and Cannon, P. F. "A physiological and biochemical approach to the systematics of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry". *Mycologia* **2000**, 92, 488-498.

²⁸ Buddie, A. G.; Martínez-Culebras, P.; Bridge, P. D.; García, M. D.; Querol, A.; Cannon, P. F. and Montes, E. "Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry". *Mycol. Res.* **1999**, 103, 385-394.

sin embargo, se conoce muy poco sobre el papel que estos compuestos desempeñan en la fisiología y en el mecanismo de infección de estos fitopatógenos.^{29,30,31}

II. TIPOS DE FUNGICIDAS MÁS UTILIZADOS CONTRA *Botrytis* Y *Colletotrichum*.

Los fungicidas se pueden clasificar de diversas formas: atendiendo a la parte de la planta que se pretenda tratar, al tipo de aplicación o al mecanismo de acción que presenten.

En el presente trabajo, distinguiremos dos tipos principales de fungicidas:³² los *protectores* y los *sistémicos*.

Se conoce con el nombre de *fungicidas protectores* a aquéllos cuya aplicación previene al huésped de una infección.

Los *fungicidas sistémicos* se caracterizan por ser asimilados por la planta y por mostrar propiedades protectoras y curativas.

El control de una enfermedad puede llevarse a cabo cuando ya han aparecido los síntomas, como en la eliminación del moho pulverulento en el trigo, o antes de que la enfermedad sea visible. Así podemos diferenciar los términos *erradicador*, *curativo* y *protector*. Estrictamente, los *fungicidas erradicadores* son activos únicamente contra los últimos y visibles estadios del ciclo de vida del hongo, por ejemplo, el micelio externo o los esporangióforos formados después del establecimiento del hongo en el huésped, o estructuras internas de la planta que provocan cambios en la apariencia del tejido afectado, por ejemplo, la clorosis. Los *fungicidas curativos* son activos contra los eventos

²⁹ Zou, W. X.; Meng, J. C.; Lu, H.; Chen, G. X.; Shi, G. X.; Zhang, T. Y. and Tan, R. X. "Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*". *Journal of Natural Products* **2000**, 63, 1529-1530.

³⁰ Lu, H.; Zou, W. X.; Meng, J. C.; Hu, J. and Tan, R. X. "New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*". *Plant Science* **2000**, 151, 67-73.

³¹ Turner, W. B. and Aldridge, D. C. "Fungal Metabolites II" **1983**, Imperial Chemical Industries, PLC, Pharmaceuticals Division, Academic Press, pp. 300, 302, 308, 397, 423.

³² Cremlin, R. J. "Agrochemicals. Preparation and Mode of Action" John Wiley & Sons, Hatfield Polytechnic, Hertfordshire, UK, 1991, pp. 1.

iniciales, pero posteriores a la penetración, del proceso de infección. El efecto visible de un fungicida curativo es el mismo que el de un compuesto protector, pero la flexibilidad, es decir, el periodo durante el que se puede ejercer control, es mucho mayor. Los *fungicidas protectores* previenen la infección; son activos frente a la germinación de las esporas, el desarrollo y crecimiento de los tubos germinativos y la formación de los apresorios.

II.1. Fungicidas protectores.

Un fungicida protector previene el desarrollo de un patógeno en la superficie de la planta antes de que tenga lugar la infección. El fungicida establece una barrera química al patógeno, y no permite que se establezca en el huésped.

Los fungicidas protectores tienen que estar presentes en la superficie de la planta antes de que las esporas fúngicas se asienten o germinen. Sólo son efectivos en el lugar de aplicación, no penetran apreciablemente en los tejidos vegetales y, en consecuencia, no son transportados por el sistema vascular de la planta. Cuando la infección aparece, un fungicida protector no puede detener el desarrollo de la enfermedad.

Entre sus desventajas se encuentra la susceptibilidad a las condiciones medioambientales (viento, lluvia y luz solar) durante largos periodos de tiempo. Por otro lado, en los cultivos en crecimiento, la expansión del tejido superficial de la hoja, del tallo y del fruto rompe la capa protectora formada por el fungicida, permitiendo la invasión de los patógenos.

Desde el punto de vista de su actividad, los fungicidas protectores pueden tener diversos puntos de acción y tienen, por tanto, un amplio espectro de actividad. En consecuencia, son compuestos que se aplican frecuentemente, a intervalos de tiempo durante el cultivo.³³

³³ Copping, L. G. and Hewitt, G. "*Chemistry and Mode of Action of Crop Protecting Agents*", The Royal Society of Chemistry **1998**, pp. 77-79.

Un buen fungicida protector debe cumplir las siguientes condiciones:³⁴

- Fitotoxicidad baja, ya que en caso contrario la planta huésped resultaría muy dañada durante su aplicación.
- Debe ser fungitóxico por sí mismo o ser capaz de convertirse en un fungicida dentro de la espora fúngica, y actuar rápidamente antes de que la infección penetre la cutícula de la planta.
- El fungicida debe poder penetrar en la espora fúngica y alcanzar el último sitio de acción en el hongo.
- La mayoría de los fungicidas protectores utilizados en agricultura se aplican como sprays foliares, y deben ser capaces de cubrir completamente la superficie de la planta y de formar depósitos resistentes a las condiciones climáticas, durante largos periodos de tiempo.

Dentro de este grupo, podemos distinguir las siguientes clases de fungicidas orgánicos: *ditiocarbamatos*, *etilenbisditiocarbamatos* (EBDCs), *ftalimidas*, *fenoles*, *clorobencenos*, *fenilpirroles* y *piridinaminas*.^{35,36}

II.1.1. Ditiocarbamatos y etilenbisditiocarbamatos (EBDCs).

El desarrollo de los fungicidas puramente orgánicos empieza realmente con el descubrimiento de la actividad de los ditiocarbamatos, que inicialmente fueron pensados como agentes vulcanizantes en la industria de las gomas. Los ditiocarbamatos y sus derivados constituyen uno de los grupos más importantes de fungicidas orgánicos para el control de enfermedades.

Son derivados del ácido ditiocarbámico, ampliamente utilizados en preparaciones fungicidas comerciales en la actualidad. Su acción fungitóxico proviene de la inhibición de las enzimas que contienen tioles y por interferir en el proceso de toma de oxígeno.

³⁴ Cremlin, R. J. "Agrochemicals, Preparation and Mode of Action", John Wiley & Sons, **1991**, pp. 158-216.

³⁵ Isaac, S. "Fungal-Plant Interactions" Chapman & Hall, eds. **1992**.

³⁶ www.alanwood.net/pesticides/index.html. "Classification of fungicides. Compendium of Pesticide Common Names-Fungicides".

Tiram (*figura II.1*) fue el primer compuesto aplicado como fungicida, y se ha utilizado especialmente contra la podredumbre gris, causada por *Botrytis*, en lechugas y fresas. Las sales férricas y de zinc del ácido dimetilditiocarbámico también poseen actividad fungicida, y se conocen con el nombre de Ferbam y Ziram, respectivamente (*figura II.1*).

Los EBDCs se diferencian de los primeros en que poseen un enlace N-H reactivo asociado con el grupo tiocarbamilo. Su toxicidad reside en su descomposición hacia cianuro, que reacciona con los tioles presentes en la célula, interfiriendo con los grupos tiol de los aminoácidos, lo que inhibe la producción de proteínas y de importantes enzimas en el patógeno.

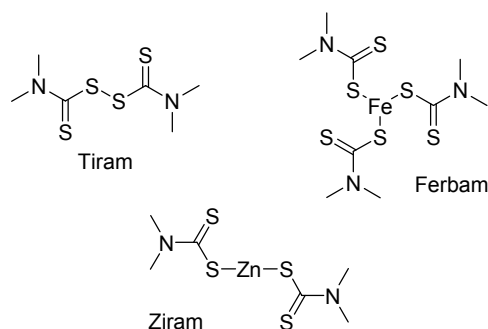


Figura II.1. Ditiocarbamatos.

Nabam o etilenbisditiocarbamato disódico (*figura II.2*) se utiliza para controlar algunas putrefacciones en las raíces, ya que como fungicida foliar tiende a ser fitotóxico y es poco resistente a la lluvia. Este producto, que es soluble en agua, ha sido reemplazado por sus sales insolubles de zinc y manganeso, compuestos conocidos como Zineb y Maneb (*figura II.2*), respectivamente. Estos, junto con Mancozeb (*figura II.2*), son unos de los fungicidas protectores más ampliamente utilizados para el control de hongos fitopatógenos.

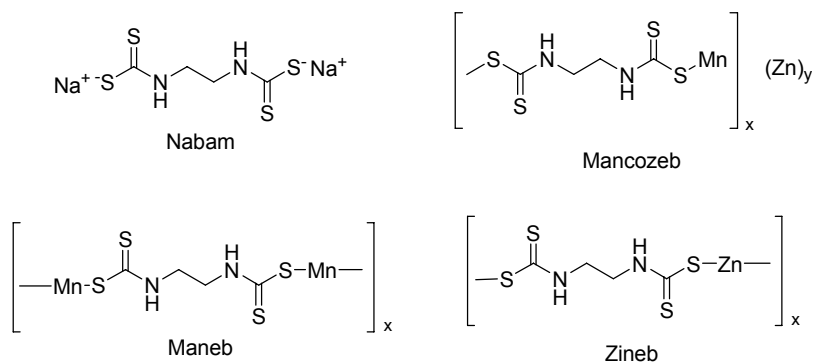


Figura II.2. Etilenbisditiocarbamatos (EBDCs).

II.1.2. Ftalimidas.

En 1951, Kittleson descubrió que ciertos compuestos con el grupo *N*-triclorometilitio eran fungicidas superficiales muy potentes. El ejemplo más significativo es Captan (*figura II.3*), que es un fungicida de aplicación foliar muy efectivo y persistente, utilizado para combatir *Botrytis* en fresas, lechuga, patatas y tomates, y para reducir la pudrición por *Gloeosporium* de manzanas. También ejerce cierto control en la caída prematura de los cítricos (PFD)³⁷, al igual que Maneb y Ferbam (*apartado II.1.1*), aunque ninguno de ellos es muy efectivo cuando se aplican por sí solos.³⁸ En EE.UU. se utiliza, al igual que Tiram (*apartado II.1.1*), para combatir las enfermedades provocadas por *Colletotrichum acutatum* en fresas.³⁹

Otros análogos desarrollados a partir de Captan como fungicidas foliares son Folpet y Captafol (*figura II.3*). Captafol y Mancozeb (*apartado II.1.1*) son unos de los fungicidas más eficaces para el control de la antracnosis.⁴⁰

³⁷ Por sus siglas en inglés: Postbloom Fruit Drop (PFD).

³⁸ Fagan, H. J. "Postbloom fruit drop of citrus in Belice: II. Disease control by aerial/ground spraying". *Turrialba* **1984**, 34, 179-186.

³⁹ Strand, L. L. "Integrated pest management for strawberries". *University of California* **1994**, Publication 3351, Oakland, CA, USA.

⁴⁰ Orozco Santos, M. and Gonzalez Garza, R. "Caída de fruto pequeño y su control en naranja "Valencia" en Veracruz". *Agric. Tec. Mex.* **1986**, 12, 259-269.

Su modo de acción está relacionado con la descomposición a tiofosgeno por la interacción con tioles celulares; éste envenena al hongo mediante la inhibición de enzimas vitales.

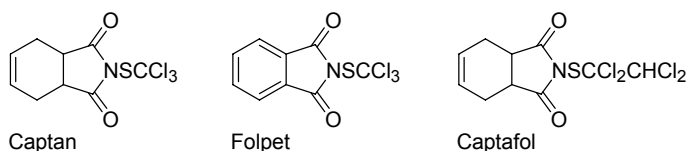


Figura II.3. Ftalimidas.

II.1.3. Fenoles.

La mayoría de los fenoles, especialmente aquellos que contienen átomos de cloro en su estructura, son tóxicos para los microorganismos; su acción bactericida se conoce desde hace mucho tiempo, y muchos de ellos son también fungicidas. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos son demasiado fitotóxicos para permitir su uso en agricultura.³⁴

Los dinitrofenoles son unos pesticidas muy versátiles, se usan tanto como fungicidas, insecticidas o herbicidas. El más conocido y utilizado es Dinocap (*figura II.4*), un efectivo fungicida de contacto para el control de mohos pulverulentos de muchos cultivos.³⁴

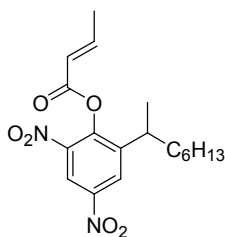


Figura II.4. Dinocap.

La actividad de muchos fenoles depende de su capacidad para interferir en el proceso de fosforilación oxidativa en las mitocondrias del patógeno. En el caso de los ésteres fenólicos, como Dinocap, la fungitoxicidad proviene de la hidrólisis *in vivo* hacia un dinitrofenol, el resto de la molécula sólo le confiere el grado de lipofilia necesario para ayudar a la penetración de la espora fúngica.³⁴

II.1.4. Clorobencenos y compuestos relacionados.

La 2,6-dicloro-4-nitroanilina fue comercializada por Boots Limited en 1959 y tiene especial valor en el control de *Botrytis* en lechugas, tomates y fresas, y contra los hongos que causan putrefacción en frutas tras su recolección. Entre otros cloronitrobenzenos con acción fungicida se encuentran Pentacloronitrobenzeno (PCNB) o Quintoceno, que fue introducido en los años 30 pero que últimamente se utiliza ampliamente como fungicida de suelos, Cloroneb y Clortalonil (figura II.5).³⁴

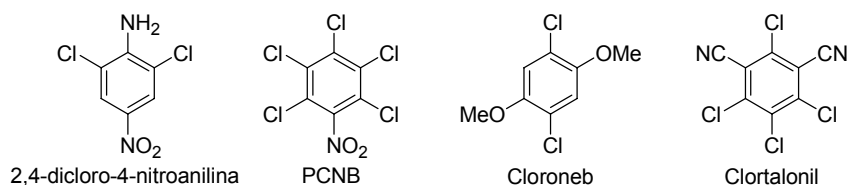


Figura II.5. Clorobencenos y compuestos relacionados.

Estos compuestos aromáticos se utilizaron inicialmente como fungicidas de suelos y presentan resistencia cruzada con las dicarboxiimidas (*apartado II.2.1*); tienen un modo de acción común, ya que los fitopatógenos que no se ven afectados por uno de estos fungicidas, también son inmunes a los demás miembros de este grupo. Generalmente se acepta que la fungitoxicidad es debida al aumento de la peroxidación de lípidos en las membranas. Estos compuestos interaccionan con las enzimas involucradas en el transporte electrónico, bloqueándolo e induciendo la generación de radicales libres, lo que conlleva la peroxidación de la membrana.³⁴

II.1.5. Fenilpirroles.

Los fenilpirroles se derivan del antibiótico pirrolnitrina, que es producido por varias especies de *Pseudomonas*. Fludioxonil (figura II.6) es un análogo de la pirrolnitrina con sustituciones en el anillo bencénico, que le confieren una mayor estabilidad frente a la luz. Así, este compuesto puede ser utilizado como fungicida foliar contra patógenos

como *Botrytis cinerea* y otros hongos relacionados.⁴¹ Dentro de este grupo también nos encontramos con los fungicidas Fenpiclonil y Fludioxonil (figura II.6).

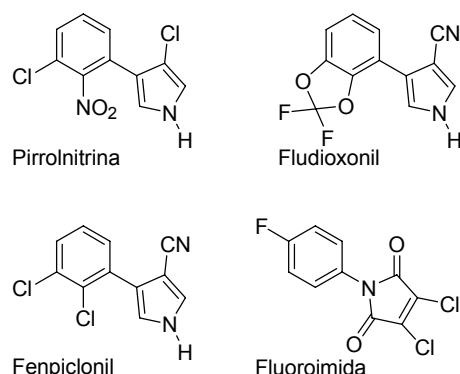


Figura II.6. Fenilpirroles.

Fludioxonil inhibe la germinación de las esporas, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio en *B. cinerea*. Aunque estos efectos son similares a los cambios inducidos por las dicarboximidas (apartado II.2.1), no se conocen casos de resistencia cruzada.⁴²

Fenpiclonil inhibe el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum coccodes*, y ha sido propuesto para el tratamiento de las semillas de tubérculos, con el objeto de prevenir la introducción del patógeno en un suelo sano.⁴³

II.1.6. Piridinaminas.

Fluazinam (figura II.7) es un nuevo fungicida protector que pertenece a la clase química de las fenilpiridinaminas. Posee un amplio espectro de actividad y es efectivo

⁴¹ Rosslenbroich, H-J. and Stuebler, D. "*Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management". *Crop Protection* **2000**, 19, 557-561.

⁴² Hilber, U. W.; Schwinn, F. J. and Schüepp, H. "Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*". *J. Phytopathol.* **1995**, 143, 423-428.

⁴³ Tsrar, L. "Etiology and control of *Colletotrichum coccodes* in potato". *Proc. Europ. Assoc. Potato Res., Pathol. Sec. Mtg.* **1998**, Umei, Sweden.

contra enfermedades producidas por hongos de las especies *Botrytis*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Pseudoperonospora*, *Venturia*, *Sclerotinia* y *Colletotrichum*.^{44,45}

Este compuesto interrumpe el proceso de producción de energía en la célula fúngica mediante un efecto de desacoplamiento en el proceso de fosforilación oxidativa.⁴⁶

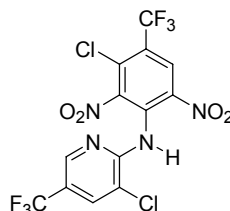


Figura II.7. Fluazinam.

El reciente desarrollo de este fungicida ha despertado el interés de los agricultores en los programas de control de resistencia, ya que es altamente activo contra cepas de *Botrytis cinerea* tolerantes a benzimidazoles y/o dicarboximidas y a la mezcla Carbendazima + Dietofencarb (*apartado II.2.2*).⁴⁷

II.1.7. Otros fungicidas protectores.

Tolilfluánida (*figura II.8*), comercializada como Euparen® Multi, es un fungicida protector y curativo polivalente de la clase química de las sulfamidas, eficaz en el control de *Botrytis*, *Didymella* o *Drepanopeziza*, entre otros hongos fitopatógenos. Está íntimamente relacionada con el fungicida Diclofluánida (*figura II.8*), aunque es más

⁴⁴ Anema, P. E. and Bouwman, J. J. "Fluazinam: a novel fungicide for use against *Phytophthora infestans* in potatoes". In: *Proc. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, pp. 663-668. **1992**, BCPC, Surrey, UK.

⁴⁵ Washington, W. S.; Shanmuganathan, N. and Forbes, C. "Fungicide control of strawberry fruit rots, and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to iprodione, benomyl and dichlofluánid". *Crop Prot.* **1992**, *11*, 355-360.

⁴⁶ Guo, Z.; Miyoshi, H.; Komyoji, T.; Haga, T. and Fujita, T. "Uncoupling activity of a newly-developed fungicide, fluazinam [3-chloro-*N*-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]". *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1056*, 89-92.

⁴⁷ Kalamarakis, A. E.; Petsikos-Panagiotarou, N.; Mavroidis, B. and Ziogas, B. N. "Activity of fluazinam against strains of *Botrytis cinerea* resistant to benzimidazoles and/or dicarboximides and to a benzimidazole-phenylcarbamate mixture", *J. Phytopathology*, **2000**, *148*, 449-455.

eficaz. Ambos poseen un modo de acción multi-localizado, actuando sobre los procesos de respiración, interfiriendo con muchas enzimas a través de sus grupos tiol.⁴⁸

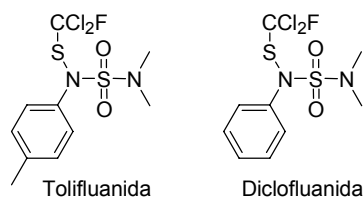


Figura II.8. Sulfamidas.

Una de las opciones más novedosas para el control de *B. cinerea* y de otros hongos relacionados, como *Monilinia* y *Sclerotinia*, es el fungicida Fenhexamida (figura II.9),^{49,50} compuesto locosistémico perteneciente a la clase química de las hidroxianilidas.

Cuando se aplica a los conidios de *B. cinerea*, Fenhexamida bloquea la germinación sólo a concentraciones relativamente altas; sin embargo, es un fuerte inhibidor de estadios del desarrollo posteriores, por ejemplo la elongación de los tubos germinativos o el crecimiento del micelio.⁵¹

Fenhexamida tiene un mecanismo de acción novedoso, diferente al de todos los demás botricidas; no muestra resistencia cruzada con ninguno de ellos, por lo que podría servir como herramienta indispensable en las estrategias de control anti-resistencia.

⁴⁸ Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority- Public Release Summary **2001**- Tolyfluanid.

⁴⁹ Kuck, K. H.; Krüger, B. W.; Roßlenbroich, H. J. and Brandes, W. "KBR2738 – nouveau fungicide de la famille des hydroxyanilides, active sur *Botrytis cinerea* and *Monilinia* spp.". *ANNP-Cinquième conférence internationale sur les maladies des plantes*, Tours 3-4-5, Décembre **1997**, pp. 1055-1062.

⁵⁰ Rosslenbroich, H.-J.; Brandes, W.; Krüger, B.-W.; Kuck, K.-H.; Pontzen, R.; Stenzel, K. and Suty, A. "Fenhexamid (KBR 2738) - A novel fungicide for control of *Botrytis cinerea* and related pathogens". *The 1998 Brighton Conference, Pests and Diseases*, **1998**, pp. 327-334.

⁵¹ Hänßler, G. and Pontzen, R. "Wirkung von Fenhexamid auf die Entwicklung von *Botrytis cinerea*". *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* **1999**, 52, 162-180.

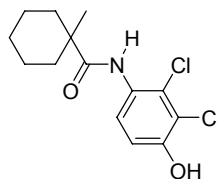


Figura II.9. Fenhexamida.

Dodina (acetato de n-dodecilguanidina, *figura II.10*) es un bactericida conocido desde 1941 y, recientemente ha mostrado actividad antifúngica.⁵² Se trata de un fungicida protector de aplicación foliar de baja toxicidad en mamíferos. La toxicidad de este compuesto y de sus análogos probablemente se debe a su habilidad para alterar la permeabilidad de la pared celular fúngica, provocando la pérdida de componentes celulares vitales, como aminoácidos y compuestos fosforados.

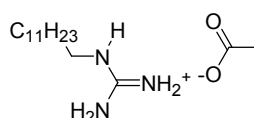


Figura II.10. Dodina

LY214352 es un fungicida experimental que inhibe la síntesis de pirimidinas.⁵³ Aunque este compuesto no ha sido comercializado, una fenoxiquinolina relacionada, Quinoxifen (DE-795, *figura II.11*), ha sido registrada recientemente como fungicida protector para el control de oídios, inhibiendo la germinación de las esporas y el desarrollo de los apresorios.⁵⁴

⁵² *The UK Pesticide Guide*, British Crop Protection Council, Bracknell, England, **1989**,

⁵³ Gustafson, G. "Nucleic acid metabolism as a target for antifungals: the mechanism of action of LY214352". In *Antifungal agents. Discovery and mode of action*. Eds. G. K. Dixon, L. G. Copping and D. W. Hollomon, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, **1995**, pp. 111-117.

⁵⁴ Longhurst, C.; Dixon, K.; Mayr, A.; Bernhard, U.; Prince, K.; Sellars, J.; Prove, P.; Richard, C.; Arnold, W.; Dreikorn, B. and Carson, C. "DE-795: a novel fungicide for the control of powdery mildew in cereals". *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases* **1996**, pp. 27-32.

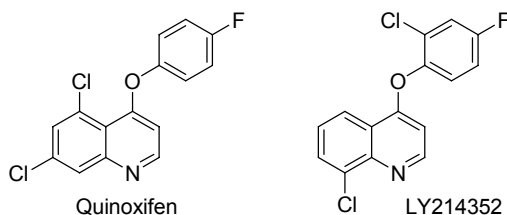


Figura II.11. Quinolinas.

II.2. Fungicidas sistémicos.

Los fungicidas sistémicos son compuestos capaces de penetrar la cutícula de las hojas y dispersarse en la planta. Se caracterizan por mostrar propiedades protectoras y curativas. Al ser asimilados y redistribuidos a lo largo de la planta, sufren conversiones metabólicas y alteraciones en su estructura, lo que conduce a un complejo patrón de reacciones bioquímicas y fisiológicas, con amplias posibilidades para la interferencia de la actividad biológica, tanto de los patógenos como del huésped.

Generalmente son compuestos con un único modo de acción, muy efectivos a bajas concentraciones, flexibles en su uso (es decir, con una eficacia aceptable sobre un amplio rango de crecimiento fúngico y estadios de infección) y que permiten un control de la enfermedad durante largos periodos de tiempo.

Estos fungicidas, al distribuirse en la planta, pueden alcanzar los lugares de infección y previenen un mayor desarrollo del patógeno. La ventaja de estos compuestos curativos es que pueden ser aplicados incluso después de que la infección fúngica haya tenido lugar, de modo que la planta tiene la oportunidad de recuperarse.

Mientras que el espectro de acción de este tipo de fungicidas es, a menudo, más estrecho que el de los protectores, el grado de control que proporcionan es superior. Desafortunadamente, este mayor control, unido al modo de acción único, se traduce en un mayor riesgo de resistencia al fungicida.

Los tipos de actividades específicas que se han atribuido a muchos fungicidas sistémicos incluyen interferencias con la síntesis de nucleótidos, la formación de polinucleótidos y proteínas, la síntesis de esteroides y de componentes de lipoproteínas de la membrana.

Un fungicida sistémico efectivo debe cumplir las siguientes condiciones:³⁴

- Debe ser fungicida o convertirse en un fungitóxico activo dentro de la planta huésped. Algunos compuestos actúan modificando la resistencia del huésped frente al ataque fúngico.
- Debe presentar muy baja fitotoxicidad. Este requisito es especialmente importante, ya que el compuesto está íntimamente en contacto con la planta huésped.
- Debe ser absorbido por las raíces, semillas u hojas de la planta, y después, debe ser translocado, al menos localmente, dentro de la planta.

Entre ellos podemos destacar: *dicarboximidas*, *carbamatos* (*bencimidazoles* y *carbanilatos*), *anilino pirimidinas*, *inhibidores de la biosíntesis de esteroides* (SBI), *compuestos organofosforados* y *estrobilurinas*.^{34,36}

II.2.1. Dicarboximidas.

Diclozolin fue la primera dicarboximida publicada y demostró ser potencialmente útil frente a *Sclerotinia* y *Botrytis*. Este compuesto ya no se comercializa, pero se han comercializado muchos compuestos relacionados, como Iprodiona, Vinclozolin, Procimidona y Clozolinato (figura II.12).

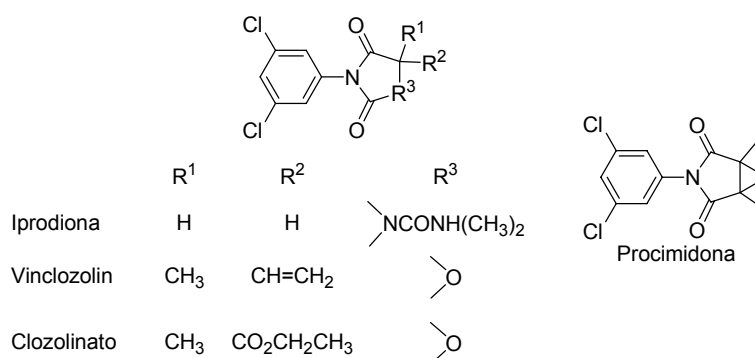


Figura II.12. Dicarboximidas.

Su desarrollo y éxito comercial fue favorecido por la coincidencia con la aparición de resistencia a los bencimidazoles.

Inhiben la germinación de las esporas y afectan a los tubos germinativos y a las hifas. Se han publicado efectos en la división celular, aunque no se ha observado inhibición significativa en el metabolismo de ácidos nucleicos, la respiración, o la síntesis de lípidos o proteínas.

Estudios recientes han aportado información sobre la similitud entre los fenilpirroles, Fenpiclonil y Fludioxonil (*apartado II.1.5*), y las dicarboximidas, respecto a sus patrones de resistencia cruzada en mutante de *Fusarium sulfureum*, sugiriendo que el modo de acción debe estar basado en la inhibición del transporte asociado a la fosforilación de la glucosa.⁵⁵

II.2.2. Carbamatos: bencimidazoles y carbanilatos.

Estos compuestos dieron lugar a una nueva era en el uso de fungicidas a finales de los años 60.

Los bencimidazoles presentan una alta afinidad por las proteínas tubulares⁵⁶ e interrumpen la mitosis en la metafase, afectando a la formación de los husos mitóticos.

La resistencia a este tipo de fungicidas, si es estable, se propaga rápidamente y desemboca en una catastrófica pérdida del control de la enfermedad. La aparición de tolerancia es un factor limitante para su uso y valor comercial. Sin embargo, no todas las dianas se ven afectadas y gracias a su amplio espectro de actividad, los bencimidazoles siguen siendo un importante grupo de fungicidas comerciales.

Fuberidazol se preparó por primera vez en 1936, pero no se explotó comercialmente hasta 1968. El mayor desarrollo comenzó en la década de los 60, y condujo a la preparación de bastantes compuestos importantes, como Benomilo, Carbendazima, Metil tiofanato (un carbamato) y Tiabendazol (*figura II.13*).

Benomilo y Carbendazima son utilizados para controlar *Botrytis cinerea* en varios cultivos. Metil tiofanato se aplica para controlar *Botrytis* y *Gloesporium*.

⁵⁵ Leroux, P.; Lanae, C. and Fritz, R. "Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*". *Pesticide Sci.* **1992**, 36, 255-261.

⁵⁶ Davidse, L. G. "Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact". *Annu. Rev. Phytopathol.* **1986**, 24, 43-65.

Benomilo es uno de los fungicidas más eficaces para el control de la caída prematura de los frutos (PFD), provocada por *Colletotrichum acutatum*, y de antracnosis pos-cosecha de cítricos, por *Colletotrichum gloeosporioides*.^{38,57,58,59} En Florida, es ampliamente utilizado solo o en combinación con Ferbam o Captafol.⁶⁰

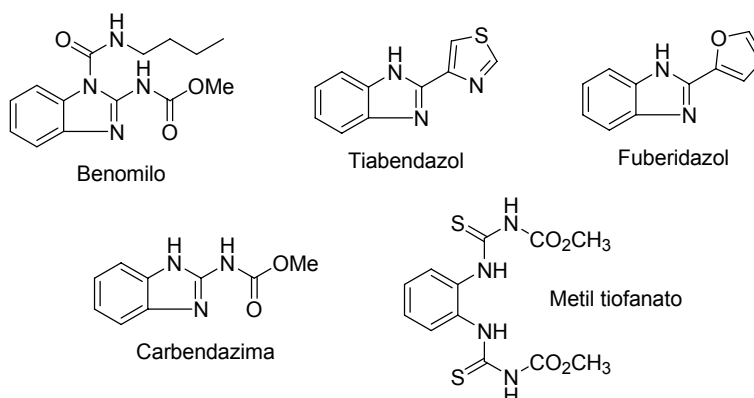


Figura II.13. Bencimidazoles.

Dietofencarb (dietoxicarbanilato de diisopropilo, *figura II.14*), un fungicida sistémico del grupo de los carbamatos que interfieren en la división celular, es muy efectivo en el control de varias especies fúngicas, especialmente contra *Botrytis*, *Cercospora* y *Venturia*, que son resistentes a los bencimidazoles.⁶¹

⁵⁷ Peres, N. A. R.; Souza, N. L.; Zitko, S. E. and Timmer, L. W. "Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*". *Plant Disease* **2002**, 86, 620-624.

⁵⁸ Timmer, L. W. "Evaluation of fungicides for control of postbloom fruit drop by *Colletotrichum acutatum*". *Fungic. Nematicide Tests* **1998**, 53, 335.

⁵⁹ Timmer, L.W.; Garnsey, S. M. and Graham, J. H. Eds. **2000**. Pp. 37-38, in *Compendium of citrus diseases*. American Phytopathological Society Press, Inc., St. Paul, MN.

⁶⁰ Timmer, L. W. and Zitko, S. E. "Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop of citrus in Florida". *Plant Dis.* **1992**, 76, 820-823.

⁶¹ a) Takahashi, J.; Nakamura, S.; Noguchi, H.; Kato, T. and Kamoshita, K. "Fungicidal activity of *N*-phenylcarbamate against benzimidazole resistant fungi". *J. Pestic. Sci.* **1988**, 13, 63-69. b) Takahashi, J.; Kirino, O.; Takayama, C.; Nakamura, S.; Noguchi, H.; Kato, T. and Kamoshita, K. "Quantitative structure-activity relationships of fungicidal *N*-(3,4-diethoxyphenyl)carbamates". *J. Pestic. Sci.* **1988**, 13, 587-593. c) Takahashi, J.; Kirino, O.; Takayama, C.; Nakamura, S.; Noguchi, H.; Kato, T. and Kamoshita, K. "Quantitative structure-activity relationships of the fungicidal methyl *N*-phenylcarbamate". *Pestic. Biochem. Physiol.* **1988**, 30, 262-271.

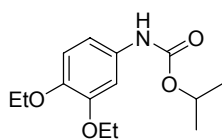


Figura II.14. Dietofencarb.

II.2.3. Anilinopirimidinas.

Este grupo de compuestos representa una nueva generación de fungicidas con actividad contra *Botrytis*, en frutas y vegetales, y presenta un modo de acción diferente. Entre otros destacan Pirimetanil, Mepanipirim y Ciprodinil (*figura II.15*). Su actividad está basada en la inhibición en la biosíntesis de aminoácidos; también bloquean la elongación de los tubos germinativos a concentraciones muy bajas.⁶² Tienen un espectro de actividad relativamente amplio, y un grado de eficacia contra *Botrytis cinerea* muy elevado.⁶³

Pirimetanil presenta como ventaja que actúa sobre las cepas de *Botrytis* resistentes a otros fungicidas, inhibiendo la secreción de las enzimas fúngicas necesarias para el proceso de infección, con lo que detiene la destrucción de las células del huésped y el

⁶² Masner, P.; Muster, P. and Schmid, J. "Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides". *Pestic. Sci.* **1994**, *42*, 163-166.

⁶³ Heye, U. J.; Speich, J.; Siegle, H.; Steineman, A.; Forster, B.; Knauf-Beiter, G.; Herzog, J. and Hubele, A. "CGA 219417: a novel broad-spectrum fungicide". *Crop Protect.* **1994**, *13*, 541-549.

crecimiento del hongo.⁶⁴ Este comportamiento se ha demostrado *in vitro* para el compuesto Mepanipirim.⁶⁵

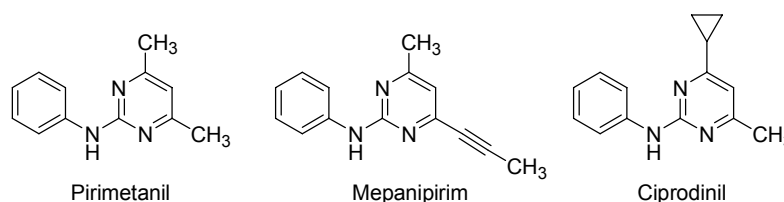


Figura II.15. Anilino-pirimidinas.

II.2.4. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBIs).

Los SBIs son ampliamente utilizados como antimicóticos y fungicidas agrícolas.^{66,67} Las alilaminas (por ejemplo, Terbinafina) son inhibidores de la epoxidación del escualeno, y se han desarrollado únicamente para uso medicinal contra hongos.⁶⁸

Los esteroides son esenciales para la célula y poseen diferentes funciones. Juegan un papel fundamental en las membranas,⁶⁹ donde se necesitan grandes cantidades de

⁶⁴ a) Winter, E. H.; Versmissen, C.; Elpers, E.; Milling, R. J. and Daniels, A. "SCALA, a new apple and strawberry fungicide with a novel mode of action". *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. **1994**, 59, 1103-1110; b) Daniels, A.; Birchmore, R. J. and Winter, E. H. "Activity of pyrimethanil on *Venturia inaequalis*". *Brighton Crop Protection Conference* **1994**, 525-532; c) Daniels, A. and Lucas, J. A. "Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 1. *In vivo* activity against *Botrytis fabae* on broad bean (*Vicia faba*) leaves". *Pestic. Sci.* **1995**, 45, 33-41; d) Milling, R. J. and Richardson, C. J. "Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*". *Pestic. Sci.* **1995**, 45, 43-48; e) Green, S. A.; Williams, R. J. and Stock, D. "Influence of formulants and salt formation on volatilization and activity of pyrimethanil". *Pestic. Sci.* **1998**, 54, 313-314.

⁶⁵ Miura, I.; Kamakura, T.; Maeno, S.; Nagata, T.; Hayashi, S.; Yamaguchi, I. "Effect of mepanipyrim on uptake of various substrates and macromolecular biosyntheses in *Botrytis cinerea*". *Pestic. Biochem. Physiol.* **1994**, 48, 222-228; *Nihon Nayaku Gakkaishi* **1994**, 19, 103-109.

⁶⁶ Vanden Bossche, H. "Chemotherapy of human fungal infections". In *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanism of Action*. Ed. H. Lyr. Gustav Fisher Verlag, Jena, **1995**, pp.431-484.

⁶⁷ Köller, W. "Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis". In *Target Sites of Fungicide Action*. Ed. W. Köller. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, **1992**, pp. 119-206.

⁶⁸ Ryder, N. S. "Squalene epoxidase-enzymology and inhibition". In *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Ed. P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey & L. G. Copping. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, **1990**, pp. 189-203.

esteroles; también están implicados en la proliferación celular, proceso para el que parece que las cantidades requeridas son mucho menores.^{70,71}

El ergosterol es sintetizado por todos los hongos, salvo los ficomicetos, en los que esta ruta biosintética no existe. Esto explica el limitado espectro de actividad de los SBIs, que no son efectivos contra este tipo de hongos, como por ejemplo *Plasmopara vitícola* y *Phytophthora infestans*. Los SBIs tampoco sirven para prevenir la germinación de las esporas, ya que éste es un proceso independiente de la biosíntesis del ergosterol.

Sin embargo, las enfermedades fúngicas más importantes comercialmente están causadas por Ascomicetos y Deuteromicetos, así que los SBIs son buenos agentes para el control de los cultivos. Por ejemplo, son efectivos contra la caída prematura de los frutos (PFD) provocada por hongos del género *Colletotrichum*,⁷² aunque todavía no están registrados para este uso en muchas zonas.

Dos grupos de compuestos SBIs se utilizan comúnmente en agricultura para la lucha contra hongos fitopatógenos filamentosos.

El grupo más amplio lo constituyen los inhibidores de la desmetilación en C14 α (DMIs) (figura II.16), que comprenden diversos compuestos químicos con un rasgo común, un heterociclo nitrogenado unido a un resto lipofílico en la posición 1 (figura II.17).

Dentro de este grupo se incluye la familia de fungicidas más numerosa y con más valor comercial, los azoles, tanto 1,2,4-triazoles como imidazoles (figura II.17). Los azoles son utilizados para controlar un amplio rango de enfermedades, especialmente en cereales (*Septoria* spp., *Puccinia* spp. y *Pseudocercospora herpotricoides*), frutas (*Venturia* spp.) y verduras.

⁶⁹ Bloch, K. E. "Sterol structure and membrane function". *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1983**, 14, 47-92.

⁷⁰ Weete, J. D. "Structure and functions of sterols in fungi". *Adv. Lipid Res.* **1989**, 23, 115-167.

⁷¹ Parks, L. W. and Casey, W. M. "Physiological implication of sterol biosynthesis in yeast". *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 95-116.

⁷² Zitko, S. E. and Timmer, L. W. "Evaluation of fungicides *in vitro* for control of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus, 1991". *Fungicide and Nematicide Tests* **1992**, 47, 335.

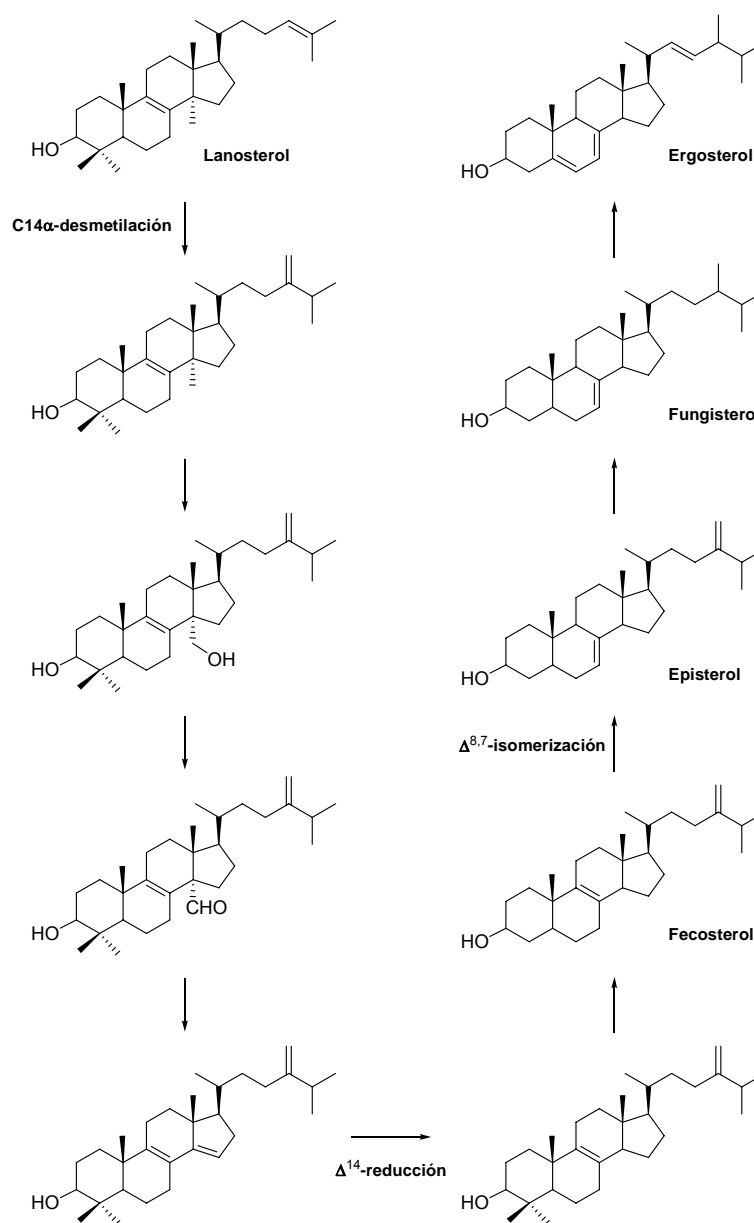


Figura II.16. Biosíntesis de ergosterol y puntos de inhibición de los distintos grupos de SBIs.

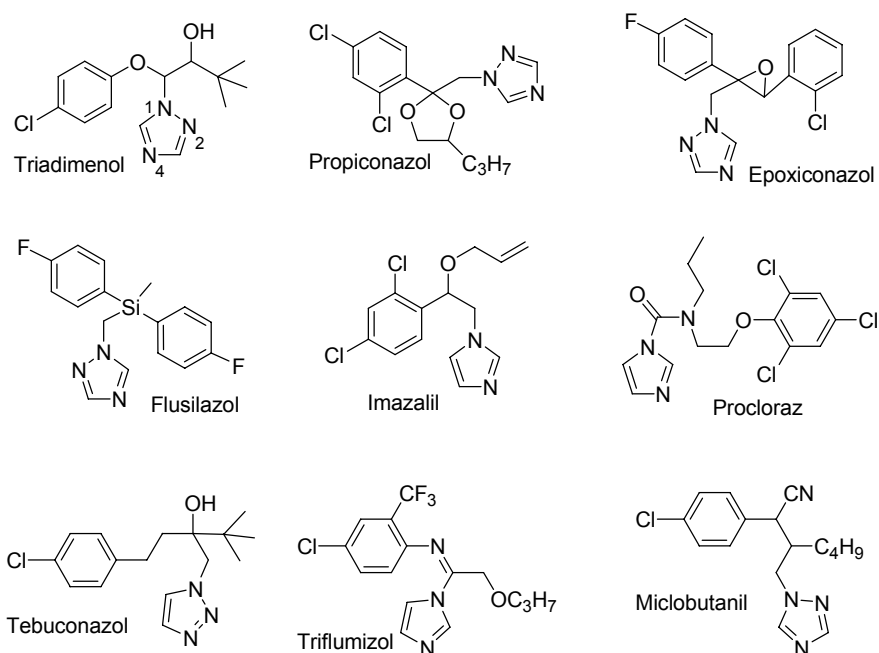


Figura II.17. Ejemplos de 1,2,4-triazoles e imidazoles.

Otros ejemplos de DMIs son los pirimidinilcarbinoles y las piperacinas (*figura II.18*). Fenarimol y Nuarimol son productos minoritarios y los únicos miembros de la familia de los pirimidinilcarbinoles, aunque el primero es el más versátil de los dos. Triforina es la única piperacina comercializada como fungicida.

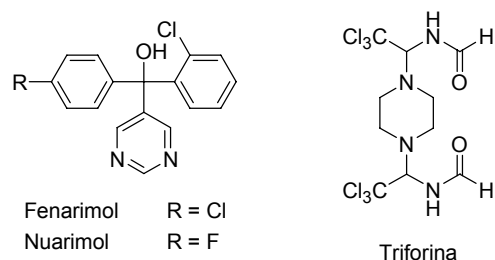


Figura II.18. Pirimidinilcarbinoles y una piperacina.

Butiobato y Pirifenox son fungicidas del grupo de las piridinas y también son ejemplos de DMIs (*figura II.19*).

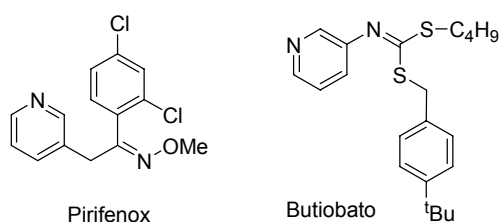


Figura II.19. Piridinas.

Las morfolinas (por ejemplo, Fenpropimorph y Tridemorph) y las piperidinas (como Fenpropidina), que constituyen el segundo grupo, son inhibidores de la $\Delta^{8,7}$ isomerasa y de la Δ^{14} reductasa (*figura II.16*).⁶⁷ Antes de la aparición de resistencia a los fungicidas tipo azoles en la podredumbre de los cereales, los inhibidores de la $\Delta^{8,7}$ isomerasa y de la Δ^{14} reductasa tenían una menor importancia, debido a su limitado espectro de actividad. Únicamente siete compuestos de este grupo han mostrado potencial comercial: Fenpropimorph, Fenpropidina, Tridemorph, Dodemorph, Aldimorph, Piperalina y Espiroxamina (*figura II.20*).

Espiroxamina (KWG 4168) es un nuevo SBI, que pertenece a la clase química de las espiroquetalaminas.⁷³ Es particularmente eficaz para el control de oídios en cereales y uvas. Este compuesto inhibe la Δ^{14} reductasa y la $\Delta^{8,7}$ isomerasa, la escualeno sintasa y la escualeno ciclasa; por tanto, muestra resistencia cruzada con las morfolinas y las piperidinas.

⁷³ Dutzmann, S.; Berg, D.; Clausen, N. E.; Kramer, W.; Kuck, K. H.; Pontzen, R.; Tiemann, R. and Weissmuller, J. "KWG4168: a novel foliar fungicide with a particular activity against powdery mildew". *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases* **1996**, pp. 47-52.

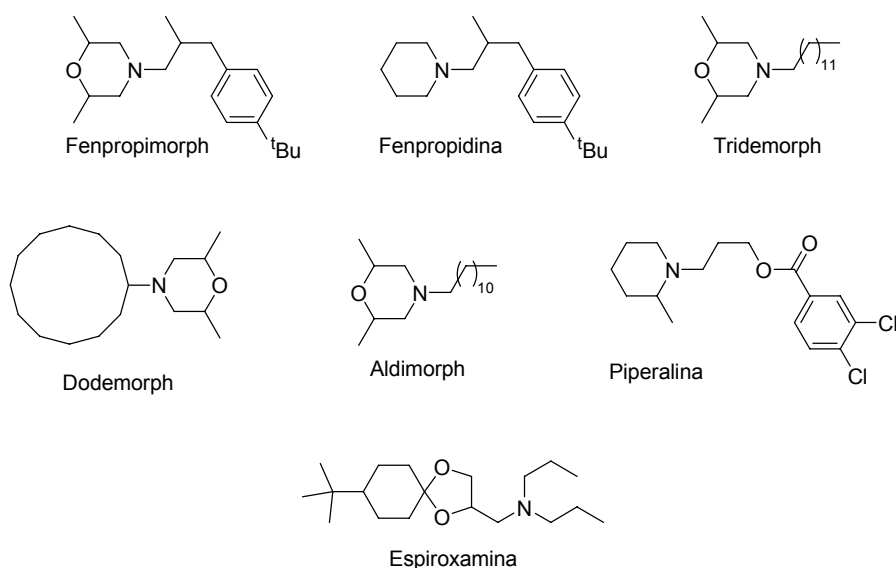


Figura II.20. Morfolinas y piperidinas.

II.2.5. Compuestos organofosforados.

Hoy en día, más de 100 compuestos organofosforados muestran actividad fungitóxica, sin embargo un número relativamente pequeño tiene utilidad práctica como fungicidas. Muchos de ellos son altamente fitotóxicos y, a menudo, son demasiado específicos contra determinadas especies de hongos.

Dentro de este grupo se encuentran Pirazofos y las amidas del ácido fosfónico, Triamifos y Ditalimfos (*figura II.21*). Pirazofos se utiliza para combatir las podredumbres, en las que inhibe la germinación de los conidios y la formación de los apresorios.

El fosfonato Fosetilo es un compuesto soluble en agua, y proporciona control sistémico sobre podredumbres en viñas, cultivos tropicales y vegetales. Se formula a menudo junto con Folpet (*apartado II.1.2*), lo que parece ser una mezcla sinérgica. Fosetilo, o su producto de degradación, el ácido fosfónico, probablemente actúa ralentizando el crecimiento del hongo y permitiendo, por tanto, a los mecanismos de defensa naturales de la planta matar finalmente al patógeno.

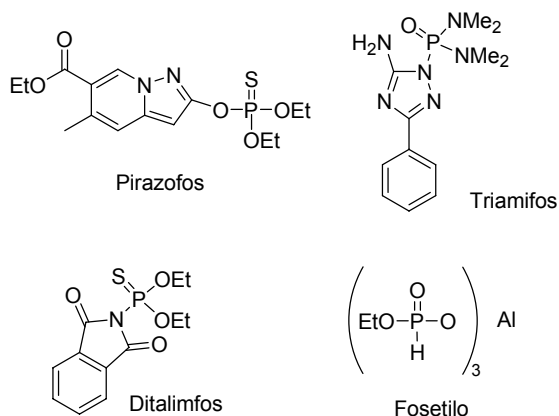


Figura II.21. Compuestos organofosforados.

II.2.6. Estrobilurinas.

Las estrobilurinas, junto con los fenilpirroles (*apartado II.1.5*), representan un grupo de fungicidas derivados de productos naturales. La aplicación directa del producto natural en el campo no fue posible debido a dificultades en su producción a gran escala, a su relativa volatilidad y a su inestabilidad fotoquímica. Así, los esfuerzos se encaminaron a una optimización química del producto natural, lo que condujo a dos fungicidas, Azoxistrobina y Kresoxima-metilo, actualmente en el mercado, desarrollados independientemente por Zeneca y Basf, respectivamente. Metominostrobin (SSF-126) fue desarrollada más tarde, y Trifloxistrobina (CGA 279202) ha sido registrada recientemente en algunos países (*figura II.22*).⁷⁴

El modo de acción único de las estrobilurinas es la inhibición de la respiración mitocondrial.

Además del efecto directo de las estrobilurinas sobre los patógenos, estos fungicidas inducen alteraciones fisiológicas en muchos cultivos, particularmente en los cereales, como una intensificada pigmentación del tejido verde de las hojas y un envejecimiento más lento de la planta, lo que los hace potencialmente beneficiosos en agricultura.⁷⁴

⁷⁴ Gullino, M. L.; Leroux, P. and Smith, C. M. "Uses and challenges of novel compounds for plant disease control". *Crop. Prot.* **2000**, 19, 1-11; y referencias citadas en el artículo.

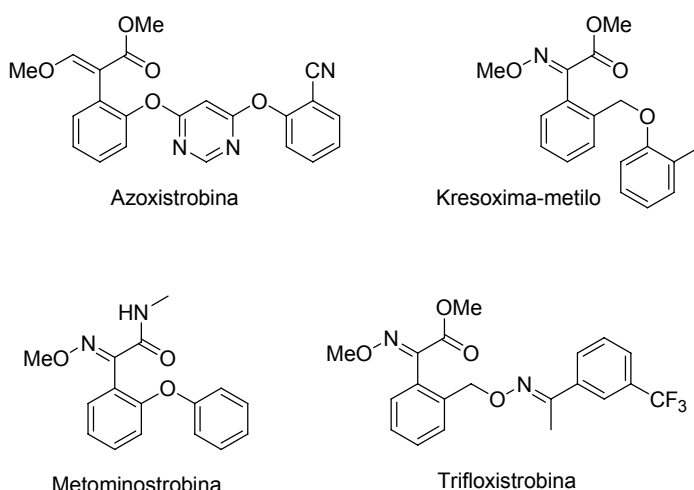


Figura II.22. Estrobilurinas.

Debido a su modo de acción, las estrobilurinas son eficaces en el control de hongos resistentes a los DMIs, fenilaminas, dicarboxiimidas y bencimidazoles. Sin embargo, este modo de acción tan específico implica un uso controlado de estos fungicidas, con el fin de evitar el desarrollo y propagación de resistencia.⁷⁴

II.2.7. Fungicidas registrados en España para el control de *Botrytis* y *Colletotrichum*.

Para el control de las enfermedades producidas por *Botrytis* y *Colletotrichum*, en España, tal y como se recoge en el registro de productos fitosanitarios,⁷⁵ sólo se permite el uso de los siguientes fungicidas, sobre determinados cultivos: Folpet, Tiram, Mancozeb, Maneb, Ziram, Captan, Clortalonil, Dodina, Tolifluanida, Iprodiona, Procimidona, Vinclozolina, Carbendazima, Dietofencarb, Metilo tiofanato, Pirimetanil, Mepanipirim, Miclobutanil.⁷⁵

En el *Anexo I* se proporciona una información más detallada para cada compuesto.

⁷⁵ Registro de Productos Fitosanitarios - Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación **2007**: www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/fitos.asp.

III. TENDENCIAS ACTUALES EN EL DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE LUCHA CONTRA *Botrytis* Y *Colletotrichum*.

La agricultura en los países desarrollados está sometida a continuos cambios en las preferencias del consumidor y a una mayor preocupación por las consideraciones éticas. La conciencia global de reducir los pesticidas químicos, que están considerados como peligrosos por algunos consumidores, ha favorecido el desarrollo de estrategias de control nuevas, beneficiosas y sostenibles. Muchos pesticidas químicos han sido o están siendo retirados (por ejemplo, los insecticidas organoclorados, bromuro de metilo) debido a su riesgo potencial para la salud humana, a la contaminación ambiental, a efectos en otros organismos no-diana o al desarrollo de resistencia a los pesticidas por parte de los patógenos.⁷⁶

Una vez que un pesticida es introducido en el medio ambiente, se producen varios procesos (adsorción en el suelo, transferencia y degradación) que determinan su persistencia, movimiento y destino final (figura III. 1).

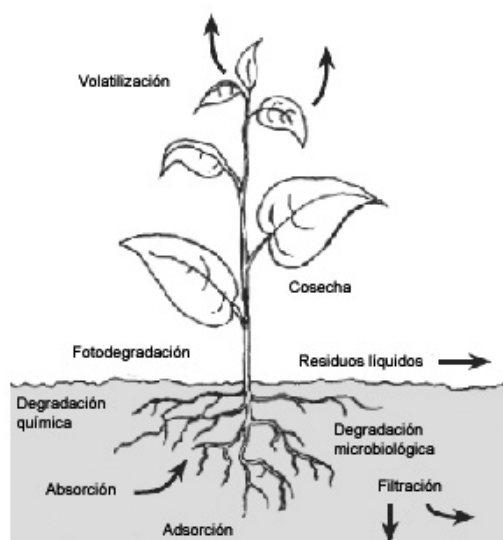


Figura III.1. Los tres principales procesos que sufren los pesticidas en el medio ambiente son adsorción, transferencia y degradación.

⁷⁶ Butt, T. M. and Copping, L. G. "Fungal biological control agents". *Pesticide Outlook* **2000**, 11, 186-191.

Estos procesos pueden ser beneficiosos, ya que pueden trasladar al pesticida hacia su diana o destruir los potenciales residuos nocivos que se generen. Sin embargo, algunas veces son perjudiciales, ocasionando un menor control de la enfermedad, afectando a otras plantas y animales, o causando daños medioambientales. Estos procesos pueden ser promovidos o prevenidos por diferentes factores climáticos y prácticas de cultivo.

En la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios sobre nuevos métodos de control de las enfermedades fúngicas, que se pueden clasificar en los siguientes campos de acción: *prácticas de cultivo*, *creación de resistencia en el huésped*, *control biológico*, *control químico* y *control integrado*.

III.1. Prácticas de cultivo.

Las prácticas de cultivo pueden reducir los niveles del inóculo y crear condiciones ambientales que sean menos favorables a una infección. Así, deben entenderse como una mejora y deberían combinarse con otros métodos de control de enfermedades fúngicas.

Entre las prácticas de cultivo se incluyen:

- Rotación de las cosechas.
- Medidas higiénicas.
- Evitar la dispersión del inóculo.
- Técnicas de cultivo.
- Control térmico.
- Tratamientos físico-químicos.^{77,78,79}

⁷⁷ Elad, Y. and Volpin, H. "Reduced development of gray mold (*Botrytis cinerea*) in bean and tomato plants by calcium nutrition". *J. Phytopathol.* **1993**, 139, 146-156. b) Schwab, M.; Noga, G. and Barthlott, W. "The influence of Mg and Ca deficiency on susceptibility of kohlrabi towards *Botrytis cinerea* infection". *Angew. Bot.* **1993**, 67, 180-185.

⁷⁸ Smilanick, J. L.; Margosan, D. M. and Mlikota Gabler, F. "Impact of ozonated water on the quality and shelf-life of fresh citrus fruit, stone fruit, and table grapes". *Ozone: Science & Engineering* **2002**, 24, 343-356.

⁷⁹ Koponen, H.; Avikainen, H. and Tahvonen, R. "The effect of disinfectants on fungal diseases of potato and vegetables". *Agricultural Science in Finland* **1993**, 2, 169-177.

III.2. Creación de resistencia en el huésped.

Aunque el sistema convencional de reproducción de los cultivos ha tenido un impacto significativo en agricultura al mejorar la resistencia de muchos cultivos frente a enfermedades importantes, tiene el inconveniente de no adaptarse con suficiente rapidez a la evolución de las nuevas cepas virulentas de hongos, ya que los procesos de cruces directos y cruzados requieren mucho tiempo e implican la selección de la progenie resistente deseada.⁸⁰ La llegada de la transformación de plantas y de las técnicas moleculares avanzadas para la reproducción vegetal proporciona herramientas muy potentes para mejorar genéticamente los cultivos así como mejorar su resistencia a enfermedades fúngicas.⁸⁰

Las plantas se encuentran bajo un constante ataque de un gran número de patógenos. Para impedir estos ataques, éstas emplean mecanismos de defensa,⁸¹ entre los que podemos destacar:

- Barreras físicas: deposición de callosa.^{82,83}
- Barreras químicas: fitoalexinas,^{84,85,86} hormonas vegetales.^{81,87}
- Resistencia dependiente de genes.

⁸⁰ Melchers, L. S. and Stuiver, M. H. "Novel genes for disease-resistance breeding". *Current Opinion in Plant Microbiology* **2000**, 3, 147-152.

⁸¹ Maor, R. and Shirasu, K. "The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens". *Current Opinion in Microbiology* **2005**, 8, 399-404.

⁸² Callosa: polímero de subunidades (1→3)-β-D-glucano presente entre la membrana plasmática y la pared celular.

⁸³ Kudlicka, K. and Brown, R. M. Jr. "Cellulose and callose biosynthesis in higher plants (I. Solubilization and separation of (1→3)- and (1→4)-β-D-glucan synthase activities from mung bean)". *Plant Physiol.* **1997**, 115, 643-656.

⁸⁴ Yang, Q.; Trinh, H. X.; Imai, S.; Ishihara, A.; Zhang, L.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y and Mayama, S. "Analysis of the involvement of hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat". *Mol. Plant Microbe Interact.* **2004**, 17, 81-89.

⁸⁵ Glawischnig, E.; Hansen, B. G.; Olsen, C. E. and Halkier, B. A. "Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 8245-8250.

⁸⁶ Osbourn, A. E. "Saponins in cereals". *Phytochemistry* **2003**, 62, 1-4.

⁸⁷ Guo, H. and Ecker, J. R. "The ethylene signalling pathway: new insights". *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, 7, 40-49.

III.2.1. Resistencia dependiente de genes.

Las plantas han evolucionado y desarrollado complejos y variados mecanismos de defensa para protegerse de herbívoros y enfermedades. Estos mecanismos pueden ser constitutivos (es decir, activos durante toda la vida de la planta) o inducidos después de un ataque por herbívoros o patógenos.

Como respuesta al ataque de patógenos, se activan numerosos genes cuya expresión da lugar a productos que degradan la pared celular de bacterias u hongos, destruyen células infectadas, etc.⁸⁸ Esta inducción no ocurre sólo en el tejido inicialmente infectado, sino en hojas y otros tejidos expuestos al patógeno gracias a señales que son transportadas a través del floema.⁸⁸

Estudios recientes han sugerido que las defensas inducibles en las plantas pudieran tener ventajas selectivas sobre las defensas constitutivas.⁸⁹ Aunque las defensas inducibles a menudo se localizan en el lugar del ataque, los mecanismos de defensa de la planta pueden ser activados de manera sistémica en toda la planta después de un ataque o una infección localizados.⁹⁰

La resistencia sistémica adquirida (SAR) describe unas respuestas de defensa no fitotóxicas y no específicas en los tejidos vegetales, que son disparadas en un punto distinto al de la infección. Este proceso es diferente a la producción de fitoalexinas, que están íntimamente asociadas con el lugar de infección. El fenómeno está basado en la inducción de proteínas antifúngicas por moléculas de señalización a larga distancia, como el ácido salicílico.⁹¹

⁸⁸ Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B. and Lucas, W. J. "The phloem as a conduit for inter-organ communication". *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 202-209.

⁸⁹ Agrawal, A.A. "Induced responses to herbivory and increased plant performance". *Science* **1998**, *279*, 1201-1202.

⁹⁰ Kessmann, H.; Staub, T.; Hofmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, G.; Ward, E.; Uknes, S. and Ryals, J. "Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals". *Annu. Rev. Phytopathol.* **1994**, *32*, 439-459.

⁹¹ Hewitt, G. "New modes of action of fungicides". *Pesticide Outlook* **2000**, *11*, 28-32.

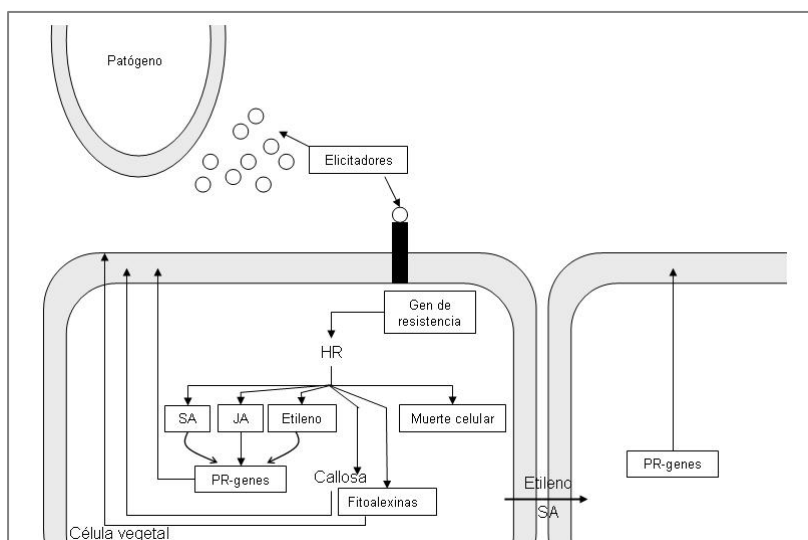


Figura III.2. Mecanismos de respuesta de defensa activados en una interacción planta-patógeno.

El uso de este fenómeno en el control de enfermedades presenta las ventajas potenciales de proporcionar una protección duradera, de muy amplio espectro y con bajo riesgo de resistencia, lo que conlleva un menor impacto sobre la naturaleza que el de la tecnología convencional. Un rasgo característico de estos inductores es que son inactivos *in vitro*, pero poseen una amplia actividad protectora *in vivo*.⁹¹

Recientes avances en este campo están relacionados con el descubrimiento de análogos funcionales al ácido salicílico. Se han identificado muchas clases de inductores de SAR químicos exógenos mediante procesos de cribado directo. Acibenzolar-S-metilo (*figura III.3*, CGA 245704, comercializado como Bion),⁹² un benzotiadiazol inductor de SAR que se distribuye por todos los tejidos vegetales, protege las plantas frente a hongos, bacterias y virus; cumple todos los requisitos de un activador de plantas, no tiene efecto directo sobre los patógenos y su modo de acción es notablemente diferente al de cualquier fungicida convencional; debe ser aplicado preventivamente, ya que se necesita que transcurra un intervalo de tiempo (que depende de la planta) para la

⁹² Kessmann, H.; Oostendorp, M.; Ruess, W.; Staub, T.; Kunz, W. and Ryals, J. "Systemic activated resistance- a new technology for plant disease control". *Pesticide Outlook* **1996**, 7, 10-13.

activación del mecanismo de defensa. Este compuesto es completamente sistémico, ya que es asimilado rápidamente por el tejido verde de la planta y translocado en ella.

Otro producto comercialmente significativo es Probenazol (*figura III.3*), que tiene un uso específico contra *Pyricularia oryzae*. Opera mediante la inducción de fungitoxinas como el ácido α -linoleico y muchas enzimas, entre las que se incluyen la fenilalanina amonio liasa y peroxidasa.⁹¹

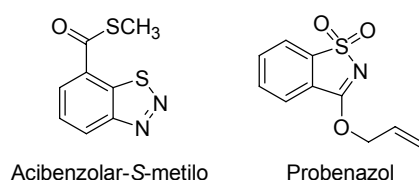


Figura III.3. Inductores de la respuesta sistémica adquirida.

III.3. Control biológico.

El control biológico de enfermedades de plantas constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo. Un concepto amplio de control biológico incluye aspectos como las prácticas de cultivo y resistencia a las enfermedades. Desde esta perspectiva se acepta que: “*El control biológico es el control de los patógenos por uno o más organismos, logrado de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, huésped o antagonistas, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas*”.

Por otra parte, se encuentra el concepto clásico que se restringe a que “*Control biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro*”. Sin embargo, y en relación a este último concepto, es necesario considerar que las interacciones de múltiples variables presentes en el medio ambiente pueden modificar las interacciones entre los microorganismos y su entorno, muchas de las cuáles pueden favorecer o impedir un control efectivo.⁹³

⁹³ McSpadden Gardener, B. B. “Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA”. *Plant Manag. Network* **2002** (<http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/top.html>).

El uso de microorganismos antagonistas de patógenos requiere de estudios previos, que se inician con la selección de potenciales microorganismos controladores de fitopatógenos, para continuar con la identificación de los mecanismos que utilizan para ejercer el control biológico y posteriormente desarrollar una formulación que se pueda producir a gran escala. Los procedimientos de aplicación de los bioantagonistas también son fundamentales para lograr los efectos de control deseados.

Un antagonista ideal debe poseer las siguientes características:⁹⁴

- Estabilidad genética.
- Eficacia a bajas concentraciones y frente a un amplio número de patógenos.
- Requisitos nutricionales simples.
- Supervivencia en condiciones ambientales adversas.
- Crecimiento sobre sustratos baratos en fermentadores.
- Ausencia de patogenicidad para la planta huésped y no producción de metabolitos tóxicos para humanos.
- Resistencia a los pesticidas más comunes y compatibilidad con otros tratamientos físicos y químicos.

La información sobre los mecanismos de acción de la mayoría de los antagonistas estudiados todavía está incompleta, debido a las dificultades existentes por las complejas interacciones que se producen entre huésped, patógeno, antagonista y otros microorganismos presentes.

Se han descrito varios mecanismos de biocontrol posibles para el control de enfermedades pos-cosecha: *antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, parasitismo o interacción directa con el patógeno, e inducción de resistencia en el tejido huésped.*⁹⁵

⁹⁴ Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. "Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice". CRC Press **1994**, Boca Raton, USA.

⁹⁵ Droby, S. and Chalutz, E. "Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases". In Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. (Eds.) *Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice* **1994**, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 63-75..

III.4. Control químico.

Los fungicidas continúan siendo de vital importancia para el control de las enfermedades vegetales. Desde su introducción en los años 60, los fungicidas sistémicos han sustituido gradualmente a los protectores, estableciendo mayores niveles de control y abriendo nuevos mercados. Los fungicidas sistémicos, como grupo, aproximadamente duplican en ventas a los protectores. Entre ellos, los SBIs constituyen el grupo líder. Sin embargo, a pesar de los avances considerables en el descubrimiento, desarrollo y uso de los productos sistémicos, los fungicidas protectores Mancozeb, Clortalonil + cobre y productos azufrados representan el 18% de las ventas totales.⁷⁴

En los últimos años, la investigación de fungicidas ha producido diversos productos con nuevos modos de acción, que se espera tengan un impacto significativo en el control de las enfermedades en la próxima década. Las nuevas clases de fungicidas incluyen anilino pirimidinas (*apartado II.2.3*), fenoxiquinolinas (*apartado II.1.7*), espiroaminas (*apartado II.2.4*), fenilpirroles (*apartado II.1.5*) y estrobilurinas (*apartado II.2.6*).⁷⁴

Un aspecto importante de la actual investigación sobre fungicidas ha sido la identificación de nuevos puntos de acción adecuados. Los avances más recientes se han originado a partir de distintas aproximaciones. Algunos fungicidas nuevos han sido descubiertos a través del tradicional cribado empírico de productos sintéticos y, en muchos casos, esto ha puesto de manifiesto dianas sin explotar. Otros han sido descubiertos a través del examen de productos naturales. Además, las nuevas técnicas de cribado, utilizando biología molecular, han permitido la evaluación de productos procedentes de varias fuentes e identificar compuestos que son capaces de desencadenar los mecanismos SAR en las plantas.⁷⁴

III.4.1. Diseño biosintético de fungicidas.

Un objetivo importante en la investigación de fungicidas es la identificación de dianas bioquímicas apropiadas y nuevas. El descubrimiento de nuevos fungicidas puede estar basado en una aproximación empírica o en el uso de un diseño racional, que implica la identificación de una diana bioquímica novedosa y la consecuente síntesis dirigida. Los inhibidores de la síntesis de esteroides (SBIs) representan un ejemplo de

desarrollo de fungicidas estimulado por el descubrimiento de un nuevo modo bioquímico de acción.

En este contexto, el conocimiento de la producción de metabolitos secundarios de los hongos fitopatógenos y del papel que juegan estos compuestos en su patogenicidad, ha favorecido el desarrollo de una nueva estrategia de control de las enfermedades fúngicas. La inhibición de las rutas metabólicas que conducen a estos metabolitos secundarios fitotóxicos podría inhibir al hongo o, al menos, reducir su virulencia.^{96,97}

De este modo, el diseño biosintético de fungicidas se caracteriza por:

- Abordar el control de factores de fitopatogenicidad, tales como fitoalexinas.
- Llevar a cabo un control selectivo del fitopatógeno en cuestión, respetando la flora epifítica presente en los cultivos.
- Usar sustancias de baja o nula toxicidad, biodegradables y que no se incorporan a la cadena alimentaria.

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* biosintetiza una serie de metabolitos con esqueleto de botriano, principalmente botridial y dihidrobotridial (*figura III.4*), que son los responsables de las manchas necróticas características de la podredumbre gris. La inhibición de la biosíntesis de estas toxinas, mediante el uso de análogos biosintéticos, ha permitido desarrollar un método alternativo de control racional del fitopatógeno, a la vez que ha abierto nuevas vías para el diseño biosintético de fungicidas selectivos.

En los últimos años, se ha estudiado un importante número de sesquiterpenos como inhibidores de la biosíntesis de botridial.⁹⁷

⁹⁶ Collado, I. G.; Cantoral, J. M.; Hernández, R.; Rebordinos, L. and Durán, R. "Inhibition of botrydial biosynthesis: an approach to the synthesis of selective fungicides". ICHEME-Environmental biotechnology 1994, 107-109.

⁹⁷ Collado, I. G.; Macías-Sánchez, A. J. and Hanson, J. R. "Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*". *Nat. Prod. Rep.* **2007**, DOI: 10.1039/b603085h.

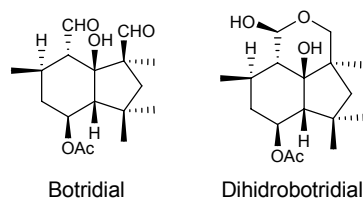


Figura III.4. Toxinas producidas por el fitopatógeno *Botrytis cinerea* con esqueleto de botriano.

Entre los compuestos estudiados en este contexto destacan aquéllos con esqueletos de ginsenano, cariofilano, *nor*-probotriano, cedrano, globulano, daucano y eremofilano.⁹⁷

III.5. Control integrado.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que la gestión racional de los cultivos requiere el uso conjunto de control tradicional, biológico y químico. Este sistema ha recibido el nombre de Gestión Integrada de Cultivos (ICM),⁹⁸ y se encuentra ampliamente extendido por todas las zonas agrícolas de los países desarrollados.

La definición aceptada de ICM es la siguiente:⁹⁹

“Una completa política de cultivos dirigida a proporcionar las bases para una producción eficiente y rentable, viable económicamente y respetuosa con el medio ambiente. Integra procesos naturales beneficiosos en prácticas de cultivo modernas utilizando tecnologías avanzadas, y su objetivo es minimizar los riesgos medioambientales, a la vez que se conservan, realzan y recrean todos los aspectos de importancia medioambiental”.

El impacto negativo en el medio ambiente, junto a las preocupaciones sobre la calidad de los alimentos, trazabilidad y salubridad, han permitido que aparezca un sistema de agricultura alternativo, que rechaza el uso indiscriminado de productos sintéticos y defiende el regreso a las aproximaciones más tradicionales, como la rotación

⁹⁸ Por sus siglas en inglés: Integrated Crop Management.

⁹⁹ Integrated Arable Crop Production Alliance (IACPA), 1995, UK.

en los cultivos. Este sistema, conocido como Agricultura Orgánica o Ecológica, ha tenido un desarrollo espectacular en Europa occidental.¹⁰⁰

El estudio de las interacciones entre las prácticas agrícolas y el medio ambiente necesita ser examinado cuidadosamente para identificar las técnicas individuales características de todos los sistemas, ya sea el ecológico, el genético, el integrado o el convencional. También deben tenerse en cuenta las demandas de la sociedad en cuanto alimentos de calidad asequibles, producidos con garantía con el mínimo impacto ecológico, con trazabilidad y generando al agricultor el beneficio suficiente para ser económicamente viable. El sistema integrado, presenta el mayor potencial para cumplir estas funciones, aunque todavía está en desarrollo y necesita alcanzar su máximo potencial.¹⁰⁰

IV. OBSERVACIONES FINALES.

El control de las enfermedades fúngicas en cultivos comerciales está entrando en un periodo de gran dinamismo, con una gran variedad de fungicidas disponibles para su uso en agricultura. Es previsible que en los próximos años se descubran nuevos compuestos mediante procesos de cribado de colecciones de productos químicos o productos naturales. La aportación del diseño bio-racional seguirá emergiendo, y los estudios bioquímicos de identificación de nuevos modos de acción se comenzarán en las etapas iniciales del proceso de descubrimiento.

La investigación de fungicidas debe también beneficiarse del desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, ya que será posible aislar e identificar genes que son expresados durante la infección. El conocimiento de las respuestas vegetales frente a la invasión de patógenos también avanzará. El conocimiento adquirido en todas estas áreas asegurará el desarrollo de nuevos fungicidas en la próxima década, con la evolución de tratamientos específicos y dirigidos, compatibles con un rápido diagnóstico de la enfermedad.

¹⁰⁰ Leake, A. "The future of integrated crop management (ICM)". *Pesticide Outlook* **2000**, 11, 138-139.

Objetivos

Una de las tareas más difíciles a las que se enfrentan las grandes firmas de agroquímicos es la de obtener fungicidas con alta eficacia y seguros desde el punto de vista medioambiental. Mientras que la mayoría de los compuestos que aparecen en las listas de pesticidas se descubrieron a través de búsquedas aleatorias de productos, en los últimos años se ha apreciado un considerable esfuerzo para el desarrollo de los fungicidas racionales basados en diferentes estrategias de diseño.

El desarrollo, en las últimas décadas, de la biología molecular y estructural ha llevado al descubrimiento de nuevas clases de fungicidas con modos de acción novedosos y que tendrán un considerable impacto en el control de las enfermedades que afectan a los cultivos comerciales en los próximos años. Se han obtenido importantes avances en el control del fitopatógeno, e indudablemente los fungicidas modernos han alcanzado un elevado nivel de eficacia, junto con una importante reducción de la toxicidad. Sin embargo, aún permanece el hecho de que la mayoría de los fungicidas utilizados son biocidas no específicos, actuando letalmente también contra organismos que no se

desean eliminar. Por ello el descubrimiento de nuevas dianas moleculares sobre las que actuar debe ser una estrategia prioritaria.

Las especies de hongos filamentosos pertenecientes al género *Colletotrichum* son consideradas como unos de los patógenos más peligrosos para la agricultura, debido a los daños que causan y al elevado número de familias de plantas que son afectadas.

Los daños causados por *Colletotrichum* se han convertido en un limitante de la producción en un alto número de cultivos comerciales, ya que pueden provocar la muerte de las plantas o disminuir drásticamente su capacidad fotosintética por la pérdida de follaje. El hongo ocasiona la caída prematura de las inflorescencias y de los frutos en desarrollo, por lo que también se ocasiona una disminución en la productividad.

Nuestro grupo de investigación viene desarrollando en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz, una línea denominada “Diseño Biosintético de Fungicidas contra Hongos Fitopatógenos”, que se basa en la inhibición de la biosíntesis de las toxinas implicadas en los procesos de infección. Para alcanzar este objetivo se trabaja fundamentalmente en dos aspectos:

- Estudio del metabolismo secundario de distintas especies de hongos fitopatógenos.
- Síntesis de análogos biosintéticos a las toxinas excretadas por dichos fitopatógenos a los medios de cultivo.

En los últimos años, el grupo de investigación encabezado por el profesor Isidro González Collado, ha extendido la metodología anterior al estudio del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

Estudios previos del caldo de cultivo de la cepa 20122 de la Colección Española de Cultivos Tipo, *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*), aislada de plantaciones de fresas canadienses, permitieron aislar, *via* acetilación de los extractos, pequeñas cantidades de (-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((-)-**1a**, derivado acetilado de gloeosporiol).

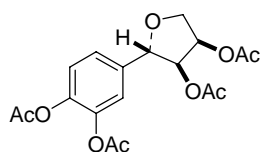


Figura II.1. Estructura propuesta para el metabolito aislado de *C. gloeosporioides* 20122.

Dado que el compuesto (-)-**la** se aisló en pequeñas cantidades, no fue posible realizar ensayos de actividad del mismo. Además, la estereoquímica relativa se asignó con la ayuda de experimentos n.O.e., pero no fue posible establecer la configuración absoluta del mismo mediante técnicas de R.M.N.¹ El interés por este compuesto se ve reforzado porque presenta una interesante analogía estructural con compuestos antioxidantes de uso en la industria alimentaria.^{2,3,4,5,6}

En este contexto se enmarca este trabajo de investigación, que tiene como objetivos concretos:

1. Estudio del metabolismo secundario de especies de hongos del género *Colletotrichum*.
2. Síntesis de (-)-gloeosporiol ((-)-**I**).

¹ Seco, J. M.; Quiñoá, E. and Riguera, R. "A practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR". *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2915-2925.

² Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalter, B. and Bartsch, H. "Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes". *Food and Chemical Toxicology* **2003**, 41, 703-717.

³ McDonald, S.; Prenzler, P. D.; Antolovich, M. and Robards, K. "Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts". *Food Chemistry* **2001**, 73, 73-84.

⁴ Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalter, B. and Bartsch, H. "Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants". *The Lancet Oncology* **2000**, 1, 107-112.

⁵ Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalter, B. and Bartsch, H. "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene". *Food and Chemical Toxicology* **2000**, 38, 647-659.

⁶ Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Spiegelhalter, B. and Bartsch, H. "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil". *European Journal of Cancer* **2000**, 36, 1235-1247.

- 2.1. Síntesis de (\pm)-gloeosporiol ((\pm)-I).
- 2.2. Síntesis enantioselectiva de (-)-gloeosporiol ((-)-I).
3. Nuevos modelos de fungicidas. Síntesis de aminoalcoholes mediante apertura regioselectiva de (\pm)-óxido de estireno con aminas, catalizada por triflato de estaño (II).
4. Ensayos de actividad fungiestática.
5. Evaluación de la actividad antioxidante de (-)-gloeosporiol ((-)-I). Actividad atrapadora de radicales libres.

Discusión de resultados

I. ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE ESPECIES DE HONGOS DEL GÉNERO *Colletotrichum*.

Entre las especies fúngicas pertenecientes al género *Colletotrichum* se encuentran algunos de los fitopatógenos más destructivos de un amplio rango de cultivos, como cereales, legumbres, frutas y vegetales.^{1,2}

¹ *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, ed. J. A. Bailey and M. J. Jeger, CAB International, Wallingford, UK, 1992, pp. 167–185.

² P. F. Cannon, P. D. Bridge and E. Montes, Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics, in *Host specificity, pathology and host-pathogen interaction of Colletotrichum*, ed. D. Prusky, S. Freeman and M. Dickman, APS Press, St Paul, Minnesota, **2000**, 1265–1267.

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorfo *Glomerella cingulata*), ampliamente distribuido por todo el mundo, ha sido objeto de numerosos estudios, incluyendo la producción de metabolitos secundarios.³

Como parte de nuestro programa de investigación sobre el control racional de hongos fitopatógenos,⁴ estamos interesados en las relaciones existentes entre la capacidad infectiva de determinados hongos fitopatógenos y el papel que juegan los metabolitos secundarios en el mecanismo de infección.

1.1. Re-estudio del metabolismo secundario de *Colletotrichum gloeosporioides* 20122. Aislamiento del compuesto (-)-la.⁵

El re-estudio del caldo de cultivo del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 condujo al aislamiento del metabolito nuevo (-)-la, aislado previamente en el estudio anterior.

El caldo de cultivo (65 L) del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* 20122⁶ fue filtrado y el medio acuoso resultante se extrajo repetidamente con acetato de etilo; lo que permitió obtener un extracto crudo (9.3 g), que, tras secado y eliminación del disolvente, fue fraccionado mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice.

³ García-Pajón, C. M. and Collado, I. G. "Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species". *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 426-431.

⁴ (a) Collado, I. G.; Hernandez-Galan, R.; Prieto, V.; Hanson, J. R. and Rebordinos, L. G. "Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*". *Phytochemistry* **1996**, 41, 513-517. (b) Collado, I. G.; Hanson, J. R.; Macias-Sanchez, A. J. and Mobbs, D. "The Biotransformation of Some Clovanes by *Botrytis cinerea*". *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1348-1351. (c) Duran-Patron, R.; Hernandez-Galan, R.; Rebordinos, L. G.; Cantoral, J. M. and Collado, I. G. "Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites with the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*". *Tetrahedron* **1999**, 55, 2389-2400. (d) Deighton, N.; Muckenschnabel, I.; Colmenares, A. J.; Collado, I. G. and Williamson, B. "Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*". *Phytochemistry* **2001**, 57, 689-692. (e) Siewers, V.; Viaud, M.; Jimenez-Teja, D.; Collado, I. G.; Gronover, C. S.; Pradier, J. M.; Tudzynski, B. and Tudzynski, P. "Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene bcbot1 of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2005**, 18, 602-612.

⁵ Tesis Doctoral Carlos M. García Pajón, Universidad de Cádiz, **2001**.

⁶ Cepa aislada de cultivos canadienses de *Fragaria* spp. (fresas) y obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Como resultado se aislaron los siguientes metabolitos: (-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((-)-**Ia***), 4-(2'-acetoxietil)fenol (**II**),^{7,8,9} 4-(1,2-diacetoxietil)-1,2-diacetoxibenceno (**III***),⁵ 3,4-diacetoxiacetofenona (**IV***),¹⁰ éster metílico del ácido 3,4-diacetoxibenzoico (**V***),^{11,12,13} 4',5'-diacetoxi-2-metoxiacetofenona (**VI***),¹⁰ éster dimetílico del ácido 4-acetoxiftálico (**VII***) y 3,4-diacetoxi-5-metoxiacetofenona (**VIII***).^{14,15}

(* Metabolitos aislados de fracciones que fueron acetiladas y metiladas para facilitar su purificación; el análisis espectroscópico se realizó con los correspondientes acetatos y ésteres metílicos).

⁷ Schneider, G.; Anke, H. and Sterner, O. Z. "Xylaramide, a New Antifungal Compound, and Other Secondary Metabolites from *Xylaria longipes*". *Naturforsch. C: Biosci.* **1996**, *51*, 802-806.

⁸ Ayer, W. A.; Browne, L. M.; Feng, M. -C.; Orszanska, H. and Saeedi-Ghomi, H. "The chemistry of the blue stain fungi. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine-beetle infected lodgepole pine". *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 904-909.

⁹ Lingappa, B. T.; Prasad, M.; Lingappa, Y.; Hunt, D. F. and Biemann, K. "Phenethyl alcohol and tryptophol, autoantibiotics produced by fungus *Candida albicans*". *Science* **1969**, *163*, 192-194.

¹⁰ Allport, D. C. and Bu'Lock, J. D. "Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*". *J. Chem. Soc.* **1960**, 654-662.

¹¹ Gardner, D. en Turner W. B. and Aldridge D. C. *Fungal Metabolites II* **1983**, Academic Press, pp. 11.

¹² Pridham, J. B. and Woodhead, S. "The biosynthesis of melanin in *Alternaria*". *Phytochemistry* **1977**, *16*, 903-906.

¹³ Yuasa, K.; Ishizuka, K. and Sasaki, T. "Metabolism of L-Tyrosine in *Aspergillus sojae*". *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 167.

¹⁴ Bassett, E. W. and Tanenbaum, S. W. "The metabolic products of *Penicillium patulum* and their probable interrelationship". *Experientia* **1958**, *14*, 38-40.

¹⁵ Nair, M. S. R. and Carey, S. T. "Metabolites of *Pyrenomyces*. Nectriapyrone, an antibiotic monoterpenoid". *Tetrahedron Letters* **1975**, *19*, 1655-1658.

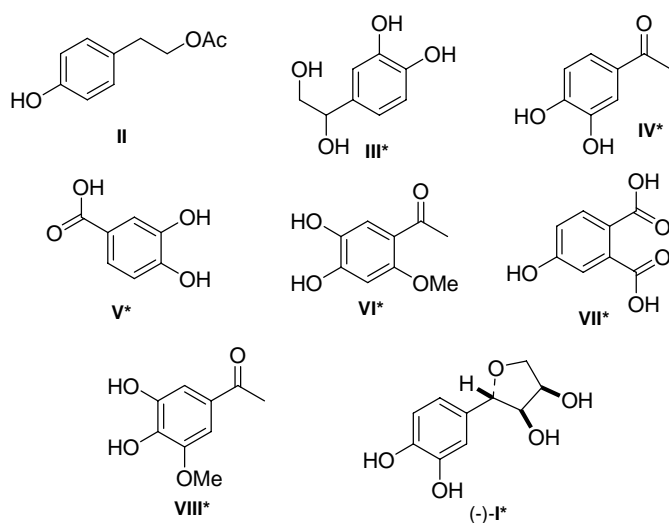


Figura I.1. Metabolitos obtenidos de los extractos del filtrado de *C. gloeosporioides* 20122.

Los datos espectroscópicos de los compuestos **II-VIII** fueron consistentes con las estructuras propuestas y coincidentes con los descritos en la bibliografía. El compuesto **(-)-I** no ha sido descrito hasta el momento y es un nuevo producto natural.

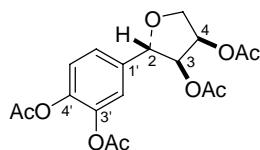


Figura I.2. (-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofuran ((-)-**Ia**).

El compuesto **(-)-Ia** se obtuvo de una fracción que fue sometida a derivatización mediante acetilación y metilación, antes de aislar sus componentes mediante HPLC. Se lograron aislar 4 mg de compuesto como una cera de color amarillento, con un $[\alpha]_D^{25}$ ($c=2$ mg/mL): -34° . La estructura se ha asignado en base a los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , IR y espectros de masas.

En el espectro de masas de baja resolución se observa el ion molecular $M+1$ a m/z 381 y en el espectro EMAR, se obtiene el fragmento de m/z 320.0895, correspondiente

al ion $M-CH_3COOH$, que está de acuerdo con la fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_7$, calculada para m/z 320.0896.

La presencia de los acetatos se confirma con las señales de RMN de 1H de los metilos, que aparecen como singletes a δ 2.09, 2.11 y 2.28 ppm; en el espectro de RMN de ^{13}C y DEPT, las señales de estos grupos se observan como dos cuartetos a δ 20.6 y 20.7 ppm. La aparición de dos únicas señales para los cuatro grupos indica la similitud que existe entre ellos, lo que también se refleja en el espectro de RMN de 1H . Los grupos carbonilo aparecen en el espectro de RMN de ^{13}C y DEPT como singletes a δ 168.0, 168.2, 169.8 y 170.0 ppm. En el espectro IR aparecen dos bandas intensas a ν 1768 y 1747 cm^{-1} , correspondientes a los carbonilos de los ésteres.

Las señales correspondientes a los protones localizados sobre el anillo aromático en el espectro de RMN de 1H , indican una trisustitución sobre el anillo en las posiciones C-1', C-3' y C-4'.

El anillo de tetrahidrofurano se une al anillo aromático a través de los carbonos C-1' y C-2. En el espectro de RMN de 1H se observa el protón H-2 a δ 4.94 ppm como un doblete de doblete. El valor de la constante de acoplamiento de 6.9 Hz indica la presencia de un protón en la posición adyacente C-3. Además existe otra constante de acoplamiento de 0.6 Hz, que se corresponde con los protones localizados en las posiciones C-2' y C-6' del anillo aromático; este acoplamiento bencílico es consistente con la localización asignada del anillo de tetrahidrofurano y la distribución de los sustituyentes sobre el anillo aromático.

El protón H-3 aparece a δ 5.03 ppm, como un doblete de doblete con J 5.2 y 6.9 Hz. La constante de 6.9 Hz se atribuye al acoplamiento en disposición relativa *trans* con el protón H-2, y la de 5.2 Hz indica el acoplamiento con un protón con orientación relativa *cis*, localizado en la posición adyacente C-4.

La señal del protón H-4 se observa como un doblete de doblete de doblete a δ 5.41 ppm, con J 4.0, 5.2 y 5.3 Hz. La constante de 5.2 Hz corresponde al acoplamiento con el protón H-3, y las otras dos constantes corresponden a los acoplamientos con los dos protones H-5b y H-5a, magnéticamente no equivalentes.

La señal a δ 3.97 ppm, que aparece como un doble doblete con J 4.0 y 10.3 Hz, se asigna al protón H-5b, ya que la constante de 10.3 Hz corresponde al acoplamiento geminal con H-5a, y la de 4.0 Hz, al acoplamiento con el protón H-4.

El protón H-5a aparece como un doble doblete, con J 5.3 y 10.3 Hz, a δ 4.43 ppm; la constante de 10.3 Hz se debe al acoplamiento con el protón geminal y la otra, con el protón H-4.

La configuración relativa de los átomos de hidrógeno localizados sobre los centros quirales C-2, C-3 y C-4, se deduce de los acoplamientos observados entre estos protones, pero sólo pudo ser confirmada por efectos n.O.e. para los protones H-3 y H-4, ambos en disposición relativa *cis*.

En el espectro de RMN de ^{13}C y DEPT, los átomos de carbono C-4 y C-5 del anillo de tetrahidrofurano se observan a δ 71.1 ppm, como un doblete y un triplete equivalentes, respectivamente. A δ 77.2 ppm aparece un doblete que se asigna a C-2, y a δ 80.4 ppm, existe un doblete, asignado a C-3. Los valores observados están de acuerdo con los desplazamientos de los átomos de carbono unidos a los átomos de oxígeno de ésteres y éteres cíclicos. La localización de las señales se correlaciona con los espectros bidimensionales COSY, HMBC y HSQC.

El metabolito presente en el hongo corresponde al fenol libre unido al anillo de tetrahidrofurano dihidroxilado, y los acetatos provienen del proceso de derivatización. En la bibliografía no se encuentran publicaciones relacionadas con el aislamiento de este metabolito de alguna de las especies de *Colletotrichum*, y tampoco se ha publicado su aislamiento de otras especies de hongos.

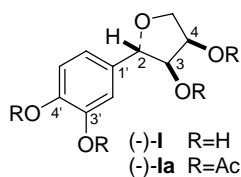


Figura I.3. Estructura de los compuestos $(-)\text{-I}$ y $(-)\text{-Ia}$.

Dado que el compuesto (-)-**1a** se aisló en pequeñas cantidades, como derivado acetilado del producto natural 2-(3',4'-dihidroxifenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-**1**), al que se ha denominado gloeosporiol, no fue posible realizar ensayos de actividad biológica, ni confirmar su estereoquímica relativa, ni determinar su estereoquímica absoluta. Por ello se decidió abordar su síntesis, que será discutida en los apartados posteriores.

I.2. Estudio del metabolismo secundario de *Colletotrichum acutatum* 364856.

Como parte del trabajo orientado al estudio del metabolismo secundario de hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* llevado a cabo en la presente Tesis, se inició el estudio del hongo *C. acutatum* 364856, aislado de plantaciones de fresas onubenses.

Se han llevado a cabo dos fermentaciones para determinar las condiciones óptimas de producción de metabolitos secundarios.

Fermentación	Inóculo	Tiempo de fermentación	Volumen	Extracto
1 ^a	8 trozos de micelio	15 días	6 litros	290 mg
2 ^a	10 trozos de micelio	14 días	22.5 litros	1864 mg

El caldo de cultivo correspondiente a *C. acutatum* 364856 fue filtrado y el medio acuoso resultante se extrajo repetidamente con acetato de etilo; esto permitió obtener un extracto crudo que, tras secado y eliminación del disolvente, fue fraccionado mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice.



Figura I.4. Fermentación de *Colletotrichum acutatum* 364856 en agitación orbital.

A continuación se muestran los esquemas seguidos en el estudio de los metabolitos secundarios del hongo fitopatógeno *C. acutatum* 364856.

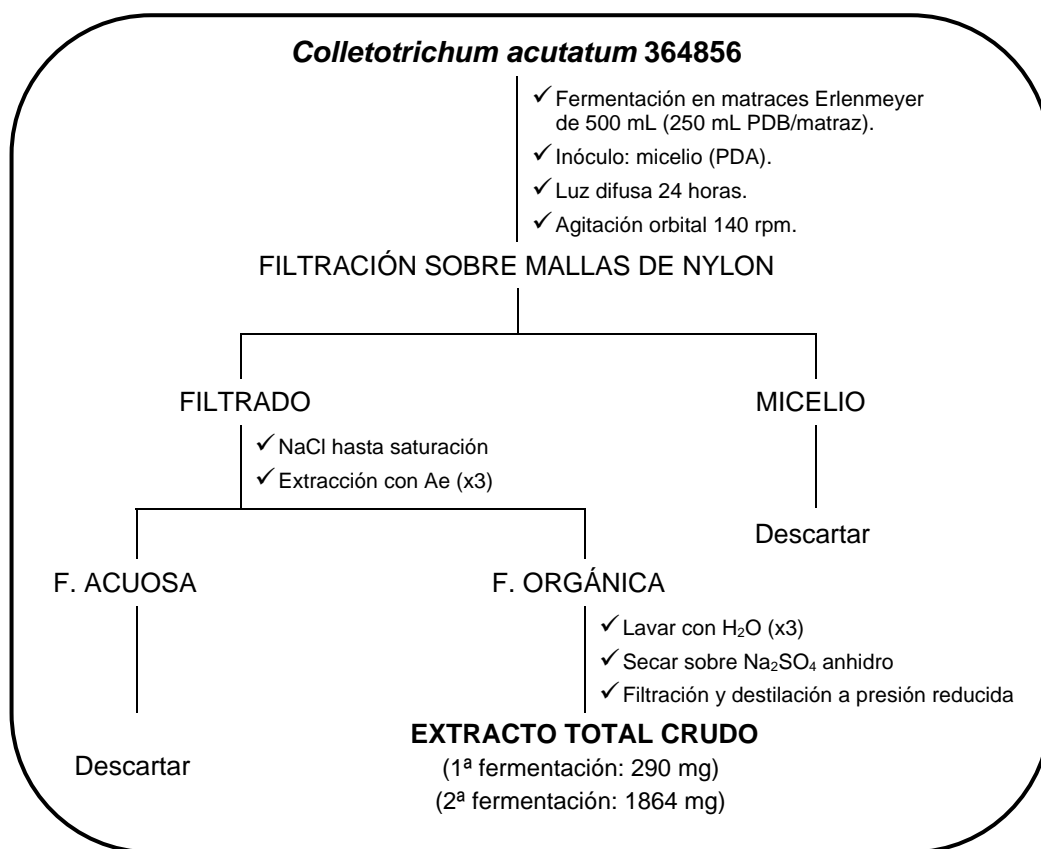


Figura I.5. Diagrama del proceso de extracción de los filtrados de los medios de cultivo de la cepa 364856 de *C. acutatum*.

El fraccionamiento del extracto crudo correspondiente a la primera fermentación, mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando gradientes de He:Ae, desde 100:0 hasta 0:100, y MeOH, tal y como se indica en la *figura I.6*, condujo a la obtención de 11 fracciones, que fueron estudiadas por RMN de ¹H. Las más interesantes fueron **F1-30** y **F1-50**, y fueron, por tanto, purificadas por HPLC, lo que permitió aislar

tres de los metabolitos descritos en la *figura I.7*: (-)-isosclerona¹⁶ (**IX**) (**F1-30** (3.0 mg)), tirosol¹⁷ (**X**) (**F1-50** (1.0 mg)) y alcohol 4-hidroxibencílico¹⁸ (**XI**) (**F1-50** (0.2 mg)).

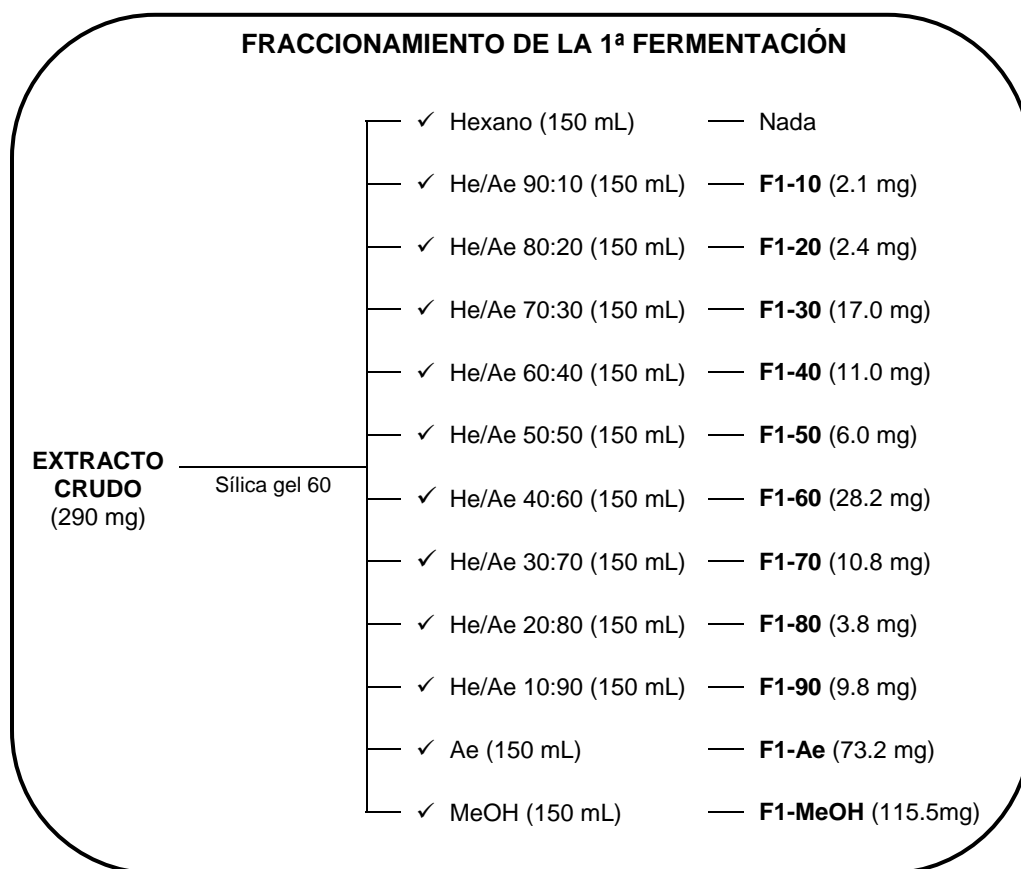


Figura I.6. Diagrama del proceso de fraccionamiento de los extractos crudos obtenidos del medio de cultivo de la 1ª fermentación de *C. acutatum* 364856.

¹⁶ Machida, K.; Matsuoka, E.; Kasahara, T. and Kikuchi, M. "Studies on the constituents of Juglans species. I. Structural determination of (4S)- and (4R)-4-hydroxy- α -tetralone derivatives from the fruit of *Juglans mandshurica* MAXIM. var. *sieboldiana* MAKINO". *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 934-937.

¹⁷ Brenna, E.; Fronza, G.; Fuganti, C. and Pincioli, M. "Differentiation of Natural and Synthetic Phenylalanine and Tyrosine through Natural Abundance ²H Nuclear Magnetic Resonance". *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4866-4872.

¹⁸ Yang, X.-D.; Zhu, J.; Rong, Y.; Liu, J.-P.; Li, L. and Zhang, H.-B. "Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*". *Nat. Prod. Res., Part A: Structure and Synthesis* **2007**, 21, 180-186.

El fraccionamiento del extracto crudo correspondiente a la segunda fermentación, mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando gradientes de He:Ae, desde 100:0 hasta 0:100, y MeOH, tal y como se indica en la *figura I.8*, condujo a la obtención de 18 fracciones, que fueron estudiadas por RMN de ^1H . Las más interesantes fueron **F2-40-2**, **F2-50**, **F2-60** y **F2-70**, y fueron, por tanto, purificadas por HPLC, lo que permitió aislar los metabolitos descritos en la *figura I.7*: (-)-isosclerona (**IX**) (**F2-40-2**, **F2-50** (3.3 mg)), tirosol (**X**) (**F2-50** (6.3 mg), **F2-60** (2.8 mg)), alcohol 4-hidroxibencílico (**XI**) (**F2-60** (0.5 mg)) y (+)-3-hidroxiisosclerona¹⁹ (**XII**) (**F2-60** (1.4 mg), **F2-70** (4.4 mg)).

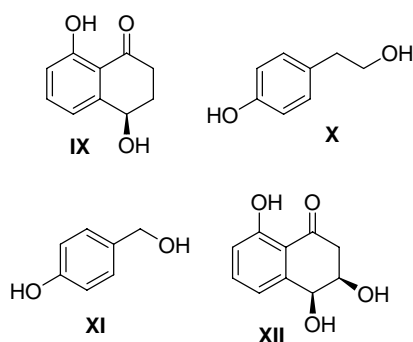


Figura I.7. Metabolitos obtenidos, hasta el momento, de los extractos del filtrado de *C. acutatum* 364856.

¹⁹ Krohn, K.; Biele, C.; Drogies, K.-H.; Steingröver, K.; Aust, H.-J.; Draeger, S. and Schulz, B. "Fusidilactones, a new group of polycyclic lactones from an endophyte, *Fusidium* sp". *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2331-2336.

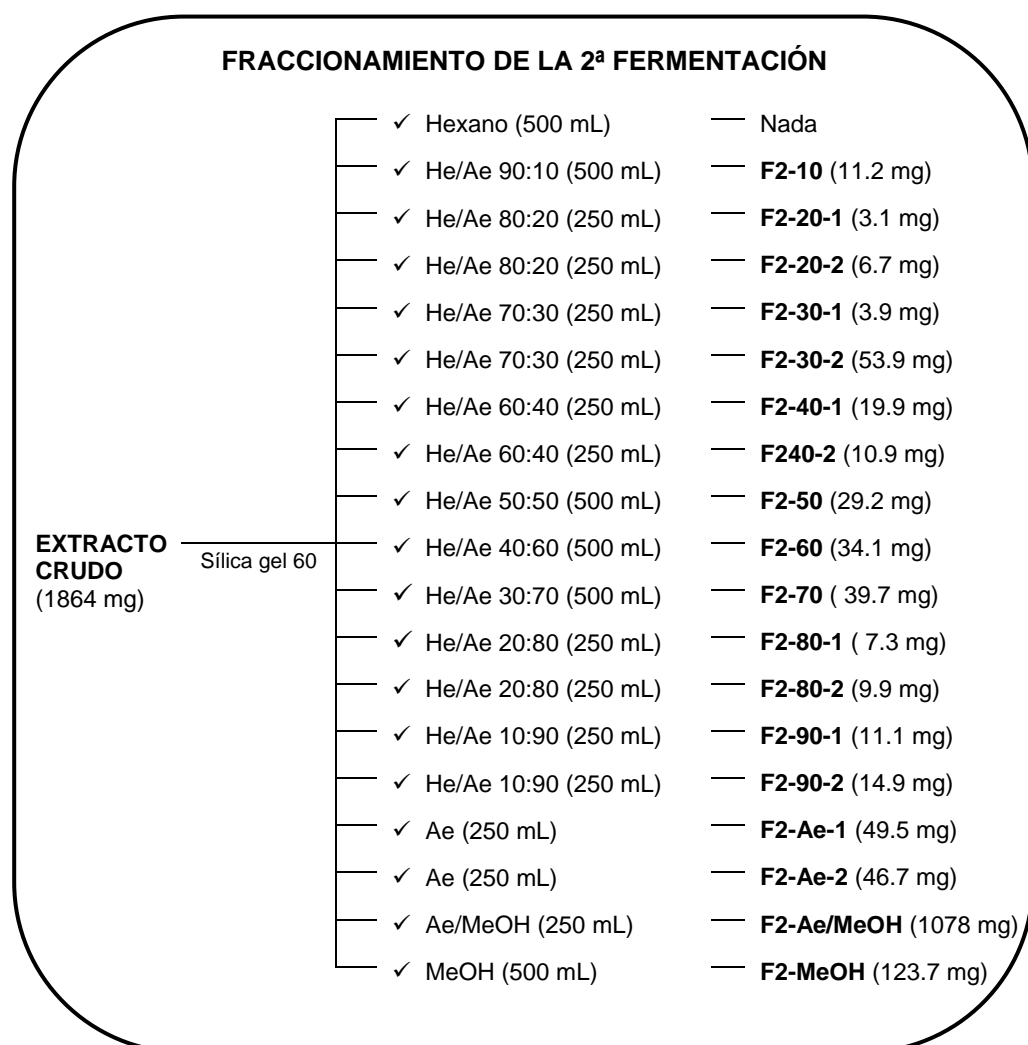
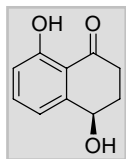


Figura I.8. Diagrama del proceso de fraccionamiento de los extractos crudos obtenidos del medio de cultivo de la 2ª fermentación de *C. acutatum* 364856.

1.2.1. (-)-Isosclerona (IX).¹⁶



El compuesto **IX** fue encontrado en los extractos de las dos fermentaciones realizadas. Su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en HPLC, lo que permitió aislar, como un aceite amarillento, 3.0 mg de la fracción **F1-30** y 3.3 mg de las fracciones **F2-40-2** y **F2-50**. El compuesto presenta actividad óptica ($[\alpha]_D^{25}$ ($c=1.5$ mg/mL CHCl_3): -9°). La estructura se ha asignado en base a los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , IR y espectros de masas.

En el espectro de masas de baja resolución se observa el ion molecular $[\text{M}]^+$ a m/z 178, que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, que predice seis insaturaciones para esta molécula.

En el espectro de IR, aparecen bandas de absorción características de grupos hidroxilo (3395 cm^{-1}), de compuestos aromáticos (1578 y 1454 cm^{-1}) y de grupos carbonilo (1637 cm^{-1}).

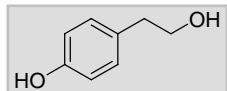
En la zona aromática del espectro de RMN de ^1H , aparecen 3 protones a δ 6.92, 7.01 y 7.49 ppm, cuyas constantes de acoplamiento confirman la trisustitución indicada para el anillo, en las posiciones C-8, C-9 y C-10. La presencia de un grupo carbonilo se confirma con la señal singlete, en el espectro de RMN de ^{13}C , a δ 204.2 ppm. No existen señales de protones olefínicos, lo que indica que en la molécula debe existir otro ciclo, que complete el número de insaturaciones previsto.

En el espectro de RMN de ^1H , a δ 12.40 ppm aparece la señal de un protón fenólico quelatado con un grupo carbonilo, y a δ 4.91 ppm existe una señal de un protón sobre oxígeno, que se corresponde con una señal a δ 67.7 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C , lo que indica la presencia de otro grupo hidroxilo en la molécula.

En la región más apantallada del espectro de RMN de ^1H , se observan 4 señales correspondientes a un sistema $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, según las constantes de acoplamiento y el experimento de correlación bidimensional $^1\text{H-}^1\text{H}$, gCOSY; esta unidad metilénica se encuentra unida por un extremo al grupo carbonilo, y por otro al sistema CH-OH , según el experimento de correlación bidimensional a larga distancia $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, gHMBC.

El estudio de los datos espectroscópicos, junto con las constantes físicas mostradas por el producto, confirmó que se trata de la (-)-isosclerona (**IX**).¹⁶

I.2.2. Tirosol (**X**).¹⁷



El compuesto **X** fue encontrado en los extractos de las dos fermentaciones realizadas. Su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en HPLC, lo que permitió aislar, como un sólido blanco, 1.0 mg de la fracción **F1-50**, 6.3 mg de **F2-50** y 2.8 mg de **F2-60**. La estructura se ha asignado en base a los datos espectroscópicos de RMN de ¹H y de ¹³C, IR y espectros de masas.

En el espectro de masas de baja resolución se observa el ion molecular [M]⁺ a *m/z* 138, que está de acuerdo con la fórmula molecular C₈H₁₀O₂, que predice cuatro insaturaciones para esta molécula.

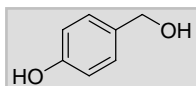
En el espectro de IR, aparecen bandas de absorción características de grupos hidroxilo (3402 cm⁻¹) y de compuestos aromáticos (1710 y 1635 cm⁻¹).

En la zona aromática del espectro de RMN de ¹H, aparecen 4 protones, equivalentes 2 a 2, a δ 6.77 y 7.09 ppm, cuyas constantes de acoplamiento confirman la disustitución en *para* indicada para el anillo.

En el espectro de RMN de ¹H, a δ 3.81 ppm aparece una señal que integra para 2 protones equivalentes sobre un carbono unido a oxígeno, cuya señal aparece en el espectro de RMN de ¹³C a δ 63.6 ppm, y cuya constante de acoplamiento indica su unión con otra unidad CH₂.

A la vista de todos estos datos espectroscópicos, se propone la estructura presentada en la figura, que coincide con los datos publicados en la bibliografía para el tirosol (**X**).¹⁷

I.2.3. Alcohol 4-hidroxibencílico (**XI**).¹⁸



El compuesto **XI** fue encontrado en los extractos de las dos fermentaciones realizadas. Su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en HPLC, lo que permitió aislar, como un sólido blanco, 0.2 mg de la

fracción **F1-50** y 0.5 mg de **F2-60**. La estructura se ha asignado en base a los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , IR y espectros de masas.

En el espectro de masas de baja resolución se observa el ion molecular $[\text{M}]^{+}$ a m/z 124, que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, que predice cuatro insaturaciones para esta molécula.

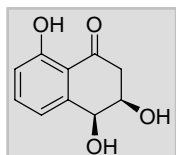
En el espectro de IR, aparecen bandas de absorción características de grupos hidroxilo (3393 cm^{-1}) y de compuestos aromáticos (1716 y 1601 cm^{-1}).

En la zona aromática del espectro de RMN de ^1H , aparecen 4 protones, equivalentes 2 a 2, a δ 6.77 y 7.16 ppm, cuyas constantes de acoplamiento confirman la disustitución en *para* indicada para el anillo. A δ 8.15 ppm, aparece una señal singlete que integra para un protón y que no se correlaciona con ninguna señal en el espectro de RMN de ^{13}C , por lo que se deduce que se trata de un grupo hidroxilo fenólico.

En el espectro de RMN de ^1H , a δ 3.89 ppm aparece una señal que integra para 2 protones equivalentes, que se correlaciona con una señal en el espectro de RMN de ^{13}C a δ 64.5 ppm, lo que indica la presencia de una unidad $\text{CH}_2\text{-OH}$ en la molécula.

A la vista de todos estos datos espectroscópicos, se propone la estructura presentada en la figura, que coincide con los datos publicados en la bibliografía para el compuesto **XI**.¹⁸

I.2.4. (+)-3-hidroxiisoscлерona (XII).¹⁹



El compuesto **XII** fue encontrado en los extractos de las dos fermentaciones realizadas. Su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en HPLC, lo que permitió aislar, como un aceite amarillento, 1.4 mg de la fracción **F2-60** y 4.4 mg de **F2-70**. El compuesto presenta actividad óptica ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ ($c=2.2\text{ mg/mL CHCl}_3$): $+2^\circ$).

La estructura se ha asignado en base a los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , IR y espectros de masas.

En el espectro de masas de baja resolución se observa el ion molecular $[M]^+$ a m/z 194, que está de acuerdo con la fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, que predice seis insaturaciones para esta molécula.

En el espectro de IR, aparecen bandas de absorción características de grupos hidroxilo (3381 cm^{-1}), de núcleos aromáticos (1639 y 1457 cm^{-1}) y de grupos carbonilo (1720 cm^{-1}).

En la zona aromática del espectro de RMN de ^1H , aparecen 3 protones a δ 6.95, 7.08 y 7.52 ppm, cuyas constantes de acoplamiento confirman la trisustitución indicada para el anillo, en las posiciones C-8, C-9 y C-10. La presencia de un grupo carbonilo se confirma con la señal singlete, en el espectro de RMN de ^{13}C , a δ 202.0 ppm. No existen señales de protones olefinicos, lo que indica que en la molécula debe existir otro ciclo, que complete el número de insaturaciones previsto.

En el espectro de RMN de ^1H , a δ 12.20 ppm aparece la señal de un protón fenólico quelatado con un grupo carbonilo, y a δ 4.38 y 4.90 ppm existen dos señales de protones sobre oxígeno, que se corresponde con las señales a δ 69.1 y 70.1 ppm, respectivamente, en el espectro de RMN de ^{13}C , lo que indica la presencia de otros dos grupos hidroxilo en la molécula.

En la región más apantallada del espectro de RMN de ^1H , se observan 2 señales correspondientes a una unidad CH_2 , según las constantes de acoplamiento y el experimento de correlación bidimensional ^1H - ^1H , gCOSY; esta unidad metilénica se encuentra unida por un extremo al grupo carbonilo, y por otro al sistema CH-OH , según el experimento de correlación bidimensional a larga distancia ^1H - ^{13}C , gHMBC.

A la vista de todos estos datos espectroscópicos, se propone la estructura presentada en la figura, que coincide con los datos publicados en la bibliografía.¹⁹

La configuración absoluta se estableció mediante la comparación de sus constantes físicas con los datos publicados.¹⁹

II. SÍNTESIS DE (±)-GLOEOSPORIOL ((±)-I).

II.1. Aproximación utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (**1**) como material de partida.

Para abordar la síntesis de (±)-gloeosporiol ((±)-I), el plan propuesto se basará en una reacción de dihidroxilación estereoselectiva de un precursor tipo dihidrofurano no conjugado, que será preparado *via* cierre de anillo por metátesis de olefinas de un compuesto adecuado (*figura II.1*), utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (**1**) como material de partida.

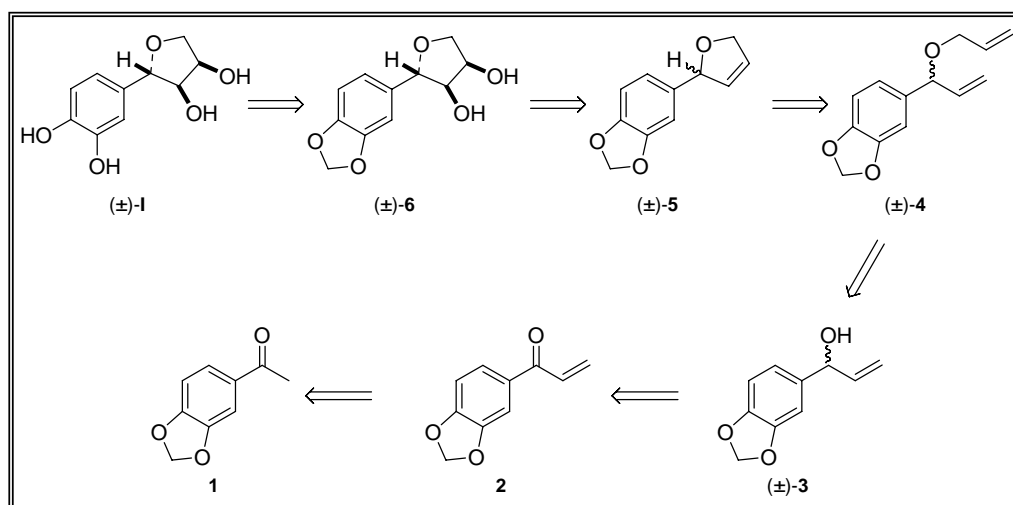
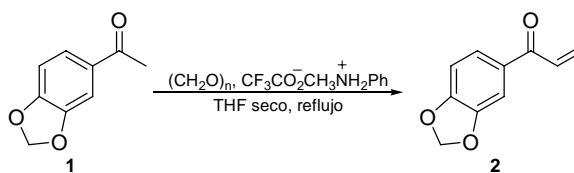


Figura II.1. Esquema retrosintético para la síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (**1**) como material de partida.

II.1.1. Síntesis del sistema de anillos.

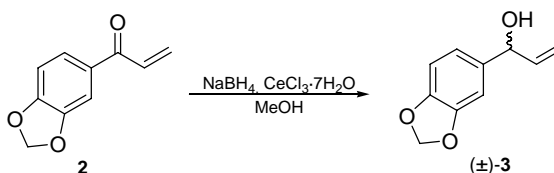
La síntesis parte de 3,4-metilendioxfenil metil cetona (**1**), que tras reacción con paraformaldehído y trifluoroacetato de *N*-metilanilinio en THF seco a reflujo,²⁰ da lugar a 3,4-metilendioxfenil vinil cetona (**2**), con un rendimiento del 37%.

²⁰ Gras, J. "Methylene Ketones and aldehydes by simple, direct methylene transfer: 2-methylene-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene". *Organic Syntheses*, CV 7, 332.



Las señales a δ 5.32, 6.37, 6.45 y 6.72 ppm en el espectro de RMN de ^1H del producto, indican la existencia del grupo vinilo en la molécula; además en el espectro de RMN de ^{13}C , aparecen 10 señales, que confirman la formación del enlace carbono-carbono; las señales a δ 132.1 y 128.5 ppm, según el experimento de correlación ^1H - ^{13}C bidimensional HETCOR, se corresponden con los protones del doble enlace. La señal a δ 187.5 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C confirma la presencia de un grupo carbonilo en la molécula.

A continuación, el producto **2** se reduce bajo las condiciones descritas por Luche ($\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en MeOH),^{21,22} para obtener el compuesto (\pm)-**3**, 1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-en-1-ol, con un rendimiento del 91%.

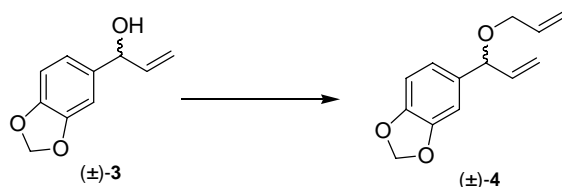


La no aparición de una señal correspondiente al carbono de un grupo carbonilo en el espectro de RMN de ^{13}C del producto obtenido ((\pm)-**3**) es crucial para asegurar que la reducción ha tenido lugar; hecho que unido a la presencia en el espectro de IR de una banda a 3405 cm^{-1} , confirma la existencia de un grupo hidroxilo en la molécula. El espectro de RMN de ^1H fue consistente con la formación de un compuesto de adición 1,2 al sistema carbonílico del compuesto **2**, puesto que éste muestra un multiplete a δ 5.83 ppm, correspondiente al protón geminal al hidroxilo y adyacente a un doble enlace.

²¹ Moreno-Dorado, F. J.; Guerra, F. M.; Aladro, F. J.; Bustamante, J. M.; Jorge, Z. D. and Massanet, G. M. "An easy route to 11-hydroxy-eudesmanolides. Synthesis of (\pm) Decipienin A". *Tetrahedron* **1999**, 55, 6997-7010.

²² Barluenga, J.; Fañanás, F. J.; Sanz, R.; García, F. and García, N. "New reduction of divinylketones to rearranged polyenyl ethers under Luche conditions". *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 4735-4736.

Para la preparación de (\pm) -1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-enil alil éter ((\pm) -4), se probaron distintas condiciones de reacción sobre el compuesto sintetizado anteriormente ((\pm) -3). Los resultados mostraron que el mejor rendimiento (87%) se obtenía cuando se trató (\pm) -3 con bromuro de alilo en potasa, tal como se muestra en la siguiente tabla.



Reactivos y condiciones de reacción	Rto.
Bromuro de alilo, carbonato potásico, acetona seca.	n. r.*
Alcohol alílico, ác. p-toluensulfónico, mol. sieves 4 A, benceno seco. ²³	n. r.*
Alcohol alílico, mol. sieves 4 A, tolueno seco.	n. r.*
Alcohol alílico, ác. p-toluensulfónico, mol. sieves 4 A, tetracianoetileno, benceno seco.	n. r.*
Bromuro de alilo, hidruro sódico, tetrahidrofurano seco. ²⁴	43%
Bromuro de alilo, hidróxido potásico. ²⁵	87%

Tabla II.1. O-alilación del compuesto (\pm) -3. (* No reacciona)

Los datos espectroscópicos para el compuesto (\pm) -4 concuerdan con la estructura propuesta, ya que en el espectro de RMN de ^1H se observan las señales correspondientes a hidrógenos sobre doble enlace y en el espectro de RMN de ^{13}C , aparecen 13 átomos de carbono, 6 correspondientes a un núcleo aromático, 4 a dobles enlaces y 3 que se corresponden con los carbonos sp^3 unidos a oxígeno.

El compuesto (\pm) -4 presenta el sistema de dobles enlaces apropiado para obtener el oxaciclo de cinco miembros deseado, mediante una reacción de cierre de anillo por

²³ Gannon, W. F. and House, H. "3-ethoxy-2-cyclohexenone (Dihydroresorcinol monoethyl ether)". *Organic Syntheses*, CV 5, 539.

²⁴ Guo, H.; Madhushaw, R. J.; Shen, F. and Liu, R. "Synthesis of chiral oxacyclic dienes via ruthenium-catalyzed enyne metathesis: useful building blocks for chiral tricyclic oxygen derivatives". *Tetrahedron* **2002**, 58, 5627-5637.

²⁵ Light, J. and Breslow, R. "A water-soluble tin hydride: tris[3-(2-methoxyethoxy)propyl]stannane". *Organic Syntheses*, CV 9, 733.

metátesis de olefinas (RCM). Este tipo de reacciones ha recibido una atención creciente en los últimos años gracias al desarrollo de catalizadores organometálicos cada vez más perfeccionados, en particular los catalizadores basados en Molibdeno de Schrock **XIII**²⁶ y los de Rutenio de Grubbs **XIV**²⁷ y **XV**,²⁸ algunos ejemplos de su utilización se detallan a continuación:

- Síntesis de anillos pequeños (5-8 miembros): anillos carbocíclicos,²⁹ oxaciclos,³⁰ azaciclos,³¹ espirociclos,³² tiociclos,³³ heterociclos de fósforo.³⁴
- Síntesis de anillos de tamaño medio y macrociclos: síntesis de éteres corona.³⁵
- Síntesis de anillos bicíclicos y policíclicos mediante metátesis eno-ino: sistemas fusionados,³⁶ poliéteres cíclicos,³⁷ azaciclos, macrolidas.³⁸

²⁶ Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Bazan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M. and O'Regan, M. "Synthesis of molybdenum imido alkylidene complexes and some reactions involving acyclic olefins". *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875-3886.

²⁷ Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. and Ziller, J. W. "Syntheses and activities of new single-component, ruthenium-based olefin metathesis catalysts". *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858-9859.

²⁸ Schaw, P.; France, M. B.; Ziller, J. W. and Grubbs, R. H. "A series of well-defined metathesis catalysts – synthesis of [RuCl₂(=CHR')(Pr(3))(2)] and its reactions". *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2039-2041.

²⁹ Fu, G. C. and Grubbs, R. H. "Synthesis of cycloalkenes via alkylidene-mediated olefin metathesis and carbonyl olefination". *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3800-3801.

³⁰ Stefinovic, M. and Snieckus, V. "Connecting directed ortho metalation and olefin metathesis strategies. Benzene-fused multiring-sized oxygen heterocycles. First syntheses of radulanin A and helianane". *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2808-2809.

³¹ Miller, S. J. and Grubbs, R. H. "Synthesis of conformationally restricted amino-acids and peptides employing olefin metathesis". *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855-5856.

³² Wallace, D. J.; Cowden, C. J.; Kennedy, D. J.; Ashwood, M. S.; Cottrell, I. F. and Dolling U. H. "Stereoselective double ring closing metathesis reactions in the synthesis of spirocyclic compounds". *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2027-2029.

³³ Shon, Y. -S. and Lee, T. R. "Catalytic Ring-Closing Olefin Metathesis of Sulfur-Containing Species: Heteroatom and Other Effects". *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1283-1286.

³⁴ Hetherington, L.; Greedy, B. and Gouverneur, V. "Ring-Closing Olefin Metathesis for the Synthesis of Phosphorus Containing Heterocycles". *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2053-2060.

³⁵ König, B. and Horn, C. "A new route to crown ethers by ruthenium-catalyzed ring closing metathesis". *Synlett* **1996**, *10*, 1013-1014.

³⁶ Zuercher, W. J.; Scholl, M. and Grubbs, R. H. "Ruthenium-catalyzed polycyclization reactions". *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4291-4298.

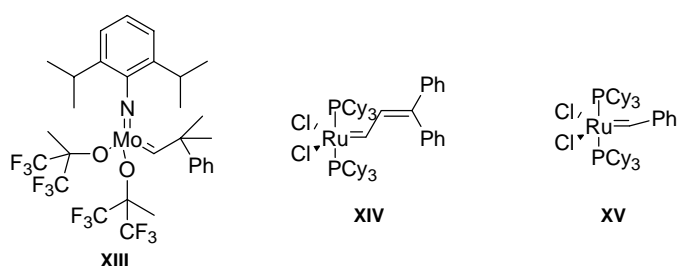
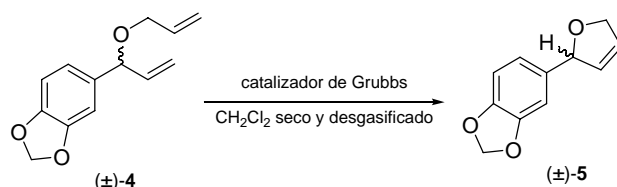


Figura II.2. Estructuras de los catalizadores de Schrock y de Grubbs.

Para obtener 2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano ((±)-**5**), se utilizó una reacción de metátesis de olefinas, utilizando el catalizador de Grubbs de primera generación (**XV**), benziliden-bis(triciclohexilfosfina)diclororutenio, sobre el compuesto (±)-**4**, que procedió con un rendimiento del 89%.



El espectro de RMN de ^1H del compuesto (±)-**5** es totalmente consistente con la estructura propuesta; así, presenta una señal a δ 5.46 ppm, correspondiente a 2 hidrógenos sobre doble enlace. En el espectro de RMN de ^{13}C , aparecen 11 átomos de carbono, 6 correspondientes a un núcleo aromático, 2 a un doble enlace y 3 que se corresponden con los carbonos sp^3 unidos a oxígeno.

³⁷ Clark, J. S.; Trevitt, G. P.; Boyall, D. et al. "Synthesis of alkenyl-substituted cyclic enol ethers by catalytic ring-closing metathesis of alkynyl ethers". *Chem. Commun.* **1998**, 23, 2629-2630.

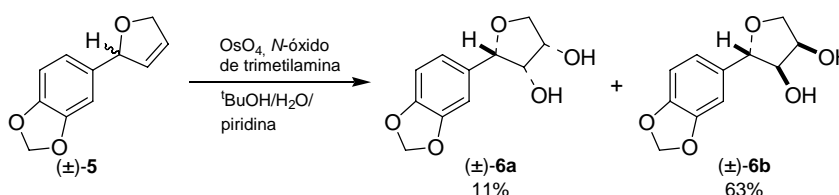
³⁸ Furstner, A. and Seidel, G. "Ring-closing metathesis of functionalized acetylene derivatives: A new entry into cycloalkynes". *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1734-1736.

II.1.2. Funcionalización del anillo de dihidrofurano.

Una vez sintetizado el sistema de anillos, el siguiente paso consistió en la funcionalización del anillo de dihidrofurano.

La estereoquímica relativa del producto natural aislado fue determinada mediante técnicas de RMN, como se comentó en el apartado 1.1, por lo que sabemos que los dos grupos hidroxilo están en disposición *cis* entre sí. El método de oxidación de olefinas con OsO₄ sobre el compuesto (±)-**5** se presentó como una buena opción para obtener el diol (±)-**6**.

El uso de esta reacción permitió obtener dos compuestos diastereoisoméricos de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((±)-**6**), todos ellos con los grupos hidroxilo en disposición relativa *cis*, pero en diferentes proporciones.



La estructura y estereoquímica relativa de cada uno de los compuestos obtenidos ((±)-**6a** y (±)-**6b**) fue determinada mediante técnicas de RMN en dos dimensiones y efectos n.O.e., lo que permitió identificar como:

- (2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((±)-**6a**).
- (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((±)-**6b**).

Como es de esperar, el producto mayoritario de la reacción es aquél que proviene de un ataque del reactivo por la cara menos impedida de la olefina precursora (±)-**5**.

Para determinar la estereoquímica relativa asignada para los compuestos anteriores nos apoyamos en los efectos n.O.e. observados y en la premisa del curso estereoquímico de la reacción de dihidroxilación con OsO₄, que, según su mecanismo, predice una adición 1,2-*syn* de los dos grupos hidroxilo sobre el doble enlace. Como se aprecia en la figura II.3, para (±)-**6a** se observan efectos n.O.e. entre los protones H-2 y H-4, H-2 y H-3 y entre H-3 y H4. Esto nos induce a asignar para (±)-**6a** la configuración

relativa ($2S(R),3R(S),4S(R)$), pues de otra manera no podrían darse los efectos n.O.e. observados, especialmente entre los protones H-2 y H-4. La estereoquímica del diol estereoisomérico (\pm)-**6b** debe ser ($2S(R),3S(R),4R(S)$), ya que sus grupos hidroxilo deben presentar disposición *cis* entre sí (de manera consistente con el mecanismo de la reacción) y la única posibilidad restante de ataque del reactivo sobre la olefina precursora (\pm)-**5** conduce a un compuesto con la estereoquímica descrita para (\pm)-**6b**.

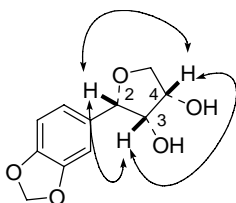


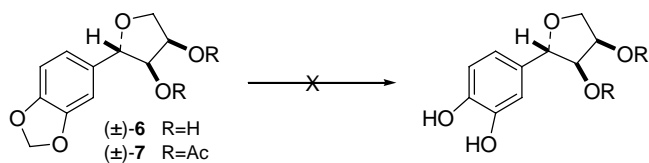
Figura II.3. Selección de correlaciones n.O.e. para el compuesto (\pm)-**6a**.

Dado que los estudios espectroscópicos realizados sobre el producto (-)-**1a** proponen una estereoquímica consistente con la establecida para el diol mayoritario (\pm)-**6b**, es este diastereoisómero el empleado para continuar la ruta de síntesis.

II.1.3. Ensayos de desprotección del grupo metilendioxi.

Llegados a este punto, el último paso en la síntesis sería la desprotección del grupo metilendioxi para obtener el compuesto (\pm)-2-(3',4'-dihidroxifenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((\pm)-**1**).

Se probaron repetidamente distintas condiciones de reacción, que se detallan a continuación, sobre los dioles (\pm)-**6a** y (\pm)-**6b** y sobre sus derivados acetilados (\pm)-**7a** y (\pm)-**7b**, pero ninguna de ellas resultó satisfactoria, ya que no se consigue quimioselectividad en la ruptura del cetal del grupo protector frente al éter bencílico.



Reactivos y condiciones de reacción	Rto.
$\text{BBr}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$, 1,2-dicloroetano, 83.5°C . ³⁹	n. r. *
$\text{BCl}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$, 1,2-dicloroetano, 83.5°C . ^{40,41}	n. r. *
AlBr_3 , EtSH, 0°C . ⁴²	n. r. *

Tabla II.2. Desprotección del grupo metilendioxi. (* No reacciona).

A continuación se resumen los resultados obtenidos mediante esta aproximación a la síntesis de (\pm) -gloeosporiol ((\pm) -I).

³⁹ Williard, P. G. and Fryhle, C. B. "Boron trihalide-methyl sulfide complexes as convenient reagents for dealkylation of aryl ethers". *Tet. Letters* **1980**, 21, 3731-3734.

⁴⁰ Teitel, S.; O'Brien, J. and Brossi, A. "Preferential cleavage of an aromatic methylenedioxy group presence of methoxyls with boron trichloride". *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3368-3369.

⁴¹ Dean, F. M.; Goodchild, J.; Houghton, L. E.; Martin, J. A.; Morton, R. B.; Parton, B.; Price, A. W. and Somvichien, N. "Boron trichloride as a selective demethylating agent". *Tet. Letters* **1966**, 35, 4153-4159.

⁴² Hu, Y. Z. and Clive, D. L. J. "Synthesis of the aromatic unit of calicheamicin γ_1^{H} ". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 9, 1421-1424.

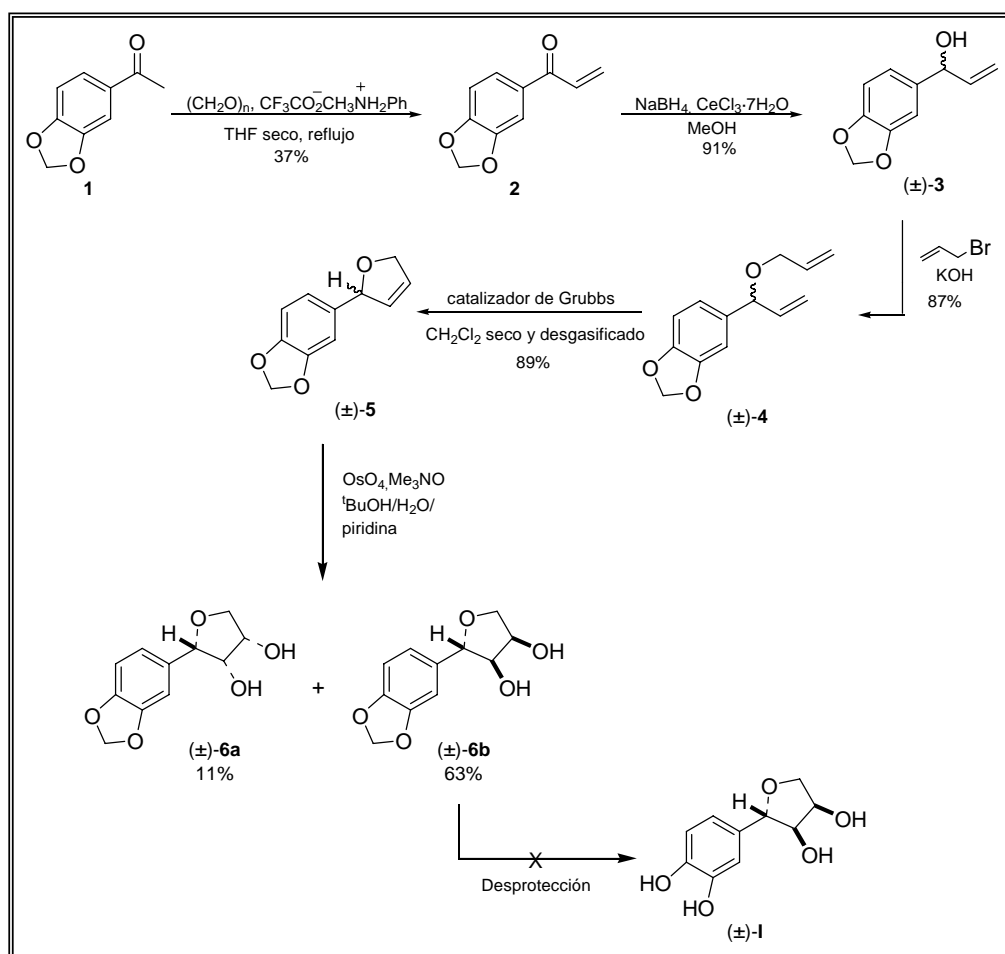


Figura II.4. Secuencia de reacciones desarrollada para la síntesis de (±)-gloeosporiol ((±)-I).

Dado que la desprotección del grupo metilendioxi para obtener (±)-gloeosporiol a partir del diol (±)-**6b** no resultó satisfactoria, se decidió cambiar la estrategia sintética, empezando con la desprotección de este grupo, e intentando completar la ruta con otro grupo protector, tal y como se describe a continuación.

II.2. Síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3,4-dihidroxibenzaldehído (**8**) como material de partida.

Para solventar el problema de la desprotección del grupo metilendioxi en el compuesto (±)-**6b**, se propone cambiar el grupo protector del catecol, tal y como se observa en la *figura II.5*, y modificar la preparación del alcohol precursor de la diolefina necesaria para la reacción de metátesis de cierre de anillo.

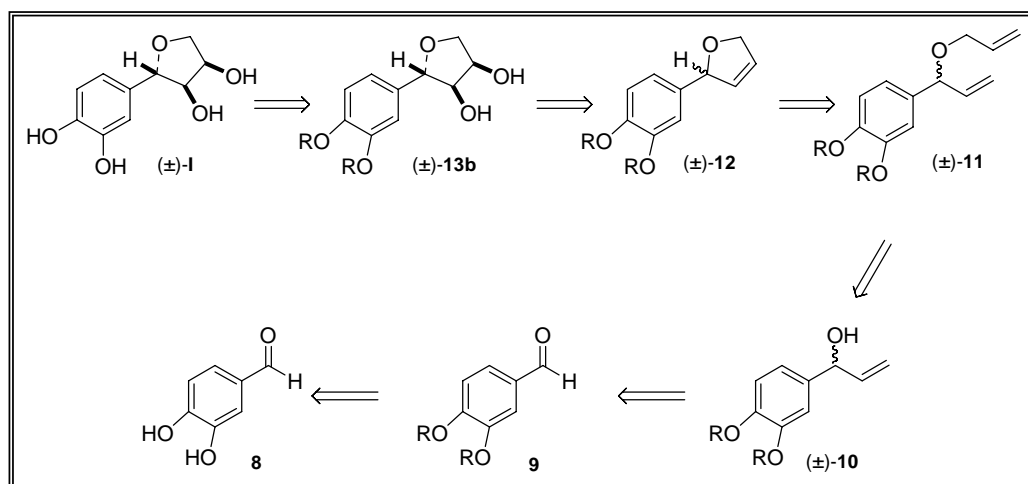
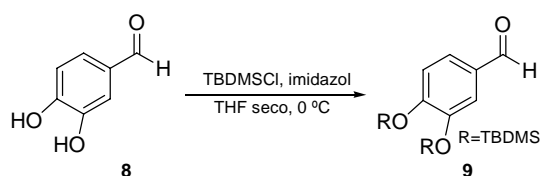


Figura II.5. Esquema retrosintético para la síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3,4-dihidroxibenzaldehído (**8**) como material de partida.

II.2.1. Síntesis del sistema de anillos.

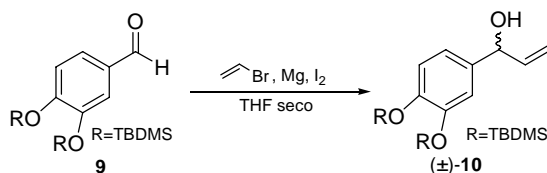
La síntesis parte de 3,4-dihidroxibenzaldehído (**8**), producto comercializado por Aldrich, que tras reacción con cloruro de *tert*-butildimetilsililo e imidazol, en THF seco a 0 °C, durante 48 horas, da lugar al compuesto **9**, con un rendimiento del 87%.



Las señales a δ 0.13 y 0.98 ppm en el espectro de RMN de ^1H del producto y a δ -4.15, -4.12, 18.5, 18.6, 25.9 y 26.0 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C , indican la existencia de los dos grupos TBDMS en la molécula. Estos datos se confirman con la

presencia en el espectro de IR de las bandas a 1256 y 841 cm^{-1} , correspondientes a los dos grupos TBDMS, y con la aparición, en el espectro de masas de baja resolución, del ion molecular $[M]^+$ a $m/z = 366$.

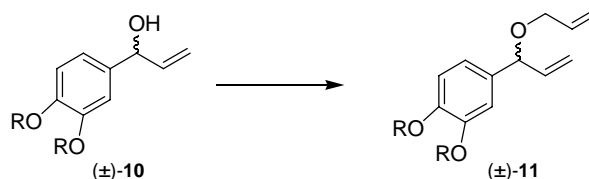
El siguiente paso en la síntesis consiste en la adición de un reactivo de Grignard sobre el sustrato protegido. De este modo, el tratamiento del compuesto **9** con bromuro de vinilmagnesio generado *in situ*, y en presencia de yodo catalítico, en atmósfera inerte de argón, permite obtener el producto (\pm)-**10** con un rendimiento del 73%.



La presencia en el espectro de IR de una banda a 3350 cm^{-1} , indica la existencia de un grupo hidroxilo en la molécula; hecho que unido a la no aparición de la señal correspondiente al hidrógeno del grupo aldehído en el espectro de RMN de ^1H , confirma que la adición al grupo carbonilo ha tenido lugar.

Las señales a δ 4.97, 5.21 y 5.91 ppm en el espectro de RMN de ^1H del producto, indican la existencia de un grupo vinilo en la molécula; además, en el espectro de RMN de ^{13}C , aparecen 15 señales, que concuerdan con el elongamiento de la cadena en dos átomos de carbono; las señales a δ 114.0 y 141.3 ppm, según el experimento de correlación ^1H - ^{13}C bidimensional HSQC, se corresponden con los carbonos del doble enlace.

Para la preparación del compuesto (\pm)-**11**, se probó un elevado número de condiciones de reacción sobre (\pm)-**10**, tal y como se detalla en la *tabla II.3*.



Reactivos y condiciones de reacción	Rto.
Bromuro de alilo, hidróxido potásico, 0 °C. ⁴³	n.r.*
Bromuro de alilo, montmorillonita K10, piridina seca, reflujo. ⁴⁴	n.r.*
Bromuro de alilo, hidróxido potásico, tetrahydrofurano con trazas de humedad.	n.r.*
Bromuro de alilo, hidruro potásico, yoduro de tetrabutilamonio, tetrahydrofurano seco. ⁴⁵	n.r.*
Bromuro de alilo, hidruro potásico, yoduro de tetrabutilamonio, tetrahydrofurano seco, 0 °C.	n.r.*
Bromuro de alilo, hidróxido potásico, tetrahydrofurano seco, 0 °C → 90 °C.	n.r.*
Bromuro de alilo, hidróxido potásico, 18-crown, tetrahydrofurano seco, 0 °C.	n.r.*
Bromuro de alilo, carbonato potásico (secado en la estufa), acetona seca, reflujo.	n.r.*
Bromuro de alilo, hidróxido potásico (previamente secado en la estufa), tetrahydrofurano seco.	n.r.*
Bromuro de alilo, diisopropilamido de litio (LDA), dimetilsulfóxido seco, -78 °C.	n.r.*
Bromuro de alilo, bis-(trimetilsilil)-amido de litio ((TMS) ₂ NLi), tetrahydrofurano seco, -50 °C.	n.r.*
Bromuro de alilo, diisopropil etil amina (DIPEA), tetrahydrofurano seco.	n.r.*
Bromuro de alilo, bis-(trimetilsilil)-amido de litio ((TMS) ₂ NLi), tetrahydrofurano seco, 90 °C.	98 %

Tabla II.3. Condiciones de reacción para la alilación de (±)-**10**. (* No reacciona)

Como se aprecia en la anterior tabla, la preparación del compuesto (±)-**11** no ha sido sencilla, pero tras numerosos intentos se ha logrado su síntesis haciendo reaccionar, en atmósfera inerte de argón y a 0 °C, el producto (±)-**10** con (TMS)₂NLi y bromuro de alilo.

Los datos espectroscópicos para el compuesto (±)-**11** son consistentes con la estructura propuesta, ya que en el espectro de RMN de ¹H se observan las señales

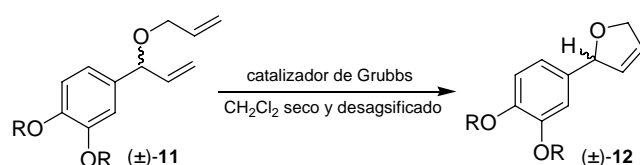
⁴³ Light, J.; Breslow, R. "A water-soluble tin hydride: tris[3-(2-methoxyethoxy)propyl]-stannane". *Organic Syntheses*, CV 9, 733.

⁴⁴ Shanmugam, P. and Rajasingh, P. "Montmorillonite K10 clay catalyzed mild, clean, solvent free one-pot protection-isomerization of the Baylis-Hillman adducts with alcohols". *Chemistry Letters* **2002**, 1212-1213.

⁴⁵ Marco, J. A.; Carda, M.; Rodríguez, S.; Castillo, E. and Kneeteman, M. N. "Synthesis of conjugated γ- and δ-lactones from aldehydes and ketones via a vinylation(allylation)-ring closing metathesis-oxidation sequence". *Tetrahedron* **2003**, 59, 4085-4101.

correspondientes a hidrógenos sobre doble enlace (δ 5.03, 5.05, 5.25, 5.30, 5.88 y 5.93 ppm); en el espectro de IR desaparece la banda correspondiente al grupo hidroxilo y en el espectro de masas de baja resolución, el ion molecular aparece a $m/z = 434$, que coincide con el peso molecular del compuesto.

El compuesto (\pm)-**11** presenta el sistema de dobles enlaces apropiado para obtener el oxaciclo de cinco miembros deseado, mediante una reacción de cierre de anillo por metátesis de olefinas (RCM), utilizando como catalizador el complejo benziliden-bis(triciclohexilfosfina)-dicloro-rutenio (catalizador de Grubbs de 1ª generación, **XV**, figura II.2); de este modo se obtiene el compuesto (\pm)-**12** con un rendimiento del 95 %.

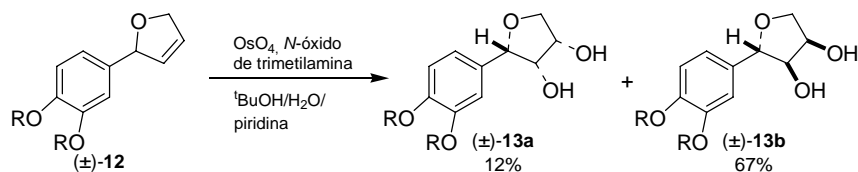


El espectro de masas muestra un pico a m/z 406, que concuerda con el peso molecular del nuevo compuesto. El espectro de RMN de ^1H del compuesto (\pm)-**12** es totalmente consistente con la estructura propuesta. Así, presenta dos señales a δ 5.50 y 5.58 ppm, correspondientes a 2 hidrógenos sobre doble enlace; y en el espectro de RMN de ^{13}C , aparecen sólo 2 señales correspondientes a carbonos de doble enlace, lo que confirma que la reacción de metátesis ha tenido lugar.

II.2.2. Funcionalización del anillo de dihidrofurano.

Una vez sintetizado el sistema de anillos, el siguiente paso sería la funcionalización del anillo de dihidrofurano, para lo que se dihidroxila la olefina (\pm)-**12** utilizando OsO_4 .

En esta reacción se obtienen dos compuestos diastereoisoméricos ((\pm)-**13a** y (\pm)-**13b**), cuya estructura y estereoquímica fue determinada mediante técnicas de RMN en dos dimensiones y efectos n.O.e., lo que permitió identificar a (\pm)-**13a** como (2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol, y a (\pm)-**13b** como (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol.



Para determinar la estereoquímica relativa asignada para los compuestos anteriores nos apoyamos en los efectos n.O.e. observados para (\pm) -**13a** y (\pm) -**13b** y en la premisa del curso estereoquímico de la reacción de dihidroxilación con OsO_4 , que, según su mecanismo, predice una adición 1,2-*syn* de los dos grupos hidroxilo sobre el doble enlace. Como se aprecia en la siguiente figura, para (\pm) -**13a** se observan efectos n.O.e. entre los protones H-2 y H-4, H-2 y H-3 y entre H-3 y H-4. Esto nos induce a asignar para (\pm) -**13a** la configuración relativa $(2S(R), 3R(S), 4S(R))$, pues de otra manera no podrían darse los efectos n.O.e. observados, especialmente entre los protones H-2 y H-4. La estereoquímica del diol estereoisomérico (\pm) -**13b** debe ser $(2S(R), 3S(R), 4R(S))$, ya que sus grupos hidroxilo deben presentar disposición *cis* entre sí (de manera consistente con el mecanismo de la reacción) y la única posibilidad restante de ataque del reactivo sobre la olefina precursora (\pm) -**12** conduce a un compuesto con la estereoquímica descrita para (\pm) -**13b**.

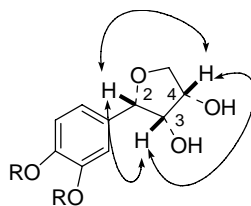
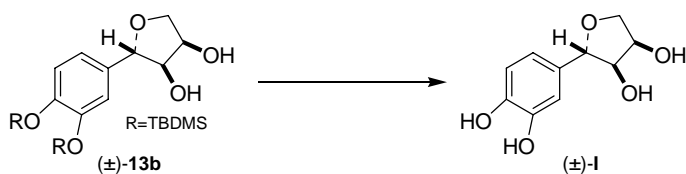


Figura II.6. Selección de correlaciones n.O.e. para el compuesto (\pm) -**13a**.

Dado que los estudios espectroscópicos realizados sobre el producto $(-)$ -**1a** proponen una estereoquímica consistente con la establecida para el diol mayoritario (\pm) -**13b**, es este diastereoisómero el empleado para continuar la ruta de síntesis.

II.2.3. Obtención de (±)-gloeosporiol y su derivado acetilado.

El último paso necesario para obtener el producto (±)-I es la eliminación los grupos TBDMS que protegen el catecol, para lo que se han probado las condiciones de reacción que se detallan a continuación:



Condiciones de reacción	Comentario
TBAF, THF seco.	Este reactivo desprotege fácilmente los grupos TBDMS, sin embargo, su posterior eliminación para purificar el producto es prácticamente imposible.
TBAF, THF seco, con work-up ácido. ⁴⁶	De igual modo, existen problemas en la purificación del producto.
HCL 4M/EtOH. ⁴⁷	Se produce la epimerización en el carbono C-2, por lo que obtenemos la mezcla de los dos tetroles, el minoritario y el mayoritario. <div style="text-align: center;"> </div>
LiCl, H ₂ O, DMF, 90°C. ⁴⁸	No reacciona.
DMSO, H ₂ O, 90°C. ⁴⁹	No reacciona.
I ₂ /MeOH, reflujo. ⁵⁰	El tetrol (±)-I se obtiene un rendimiento del 36%.

⁴⁶ Hua, D. H.; Huang, X.; Chen, Y.; Battina, S. K.; Tamura, M.; Noh, S. K.; Koo, S. I.; Namatame, I.; Tomoda, H.; Perchellet, E. M. and Perchellet, J. P. "Total Syntheses of (+)-Chloropuupehenone and (+)-Chloropuupehenol and Their Analogues and Evaluation of Their Bioactivities". *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6065-6078.

⁴⁷ Ohzeki, T. and Mori, K. "Synthetic racemate and enantiomers of cytosporone E, A metabolite of an endophytic fungus, show indistinguishably weak antimicrobial activity". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 2584-2590.

⁴⁸ Farràs, J.; Serra, C. and Vilarrasa, J. "Cleavage of tert-butyldimethylsilyl ethers by chloride ion". *Tet. Lett.* **1998**, 39, 327-330.

⁴⁹ Maiti, G. and Roy, S. C. "A mild and efficient method for the selective cleavage of tert-butyldimethylsilyl ethers to alcohols". *Tet. Lett.* **1997**, 38, 495-498.

⁵⁰ Vaino, A. R. and Szarek, W. A. "A mild and efficient method for the deprotection of tert-butyldimethylsilyl ethers using iodine in methanol". *Chem. Commun.* **1996**, 2351-2352.

Cuando se hace reaccionar el compuesto (\pm)-**13b**, con $I_2/MeOH$, a reflujo, se obtiene el compuesto (\pm)-**I** con un rendimiento del 36%; los datos espectroscópicos para este compuesto concuerdan con la estructura propuesta para el compuesto (\pm)-**I**, ya que en el espectro de RMN de 1H han desaparecido las señales correspondientes a los grupos TBDMS.

Una vez preparado el compuesto (\pm)-**I** se procedió a evaluar su actividad fitotóxica *in vivo* sobre hojas de *Phaseolus vulgaris* (*Parte Experimental, apartado I.5*) y su actividad fungistática (*Parte Experimental, apartado I.4*) frente a *Botrytis cinerea* 2100, resultando en ambos casos inactivo.

La acetilación de todos los grupos hidroxilo libres del compuesto sintético obtenido (\pm)-**I** por desprotección de (\pm)-**13b**, condujo a la obtención de un compuesto cuyos datos espectroscópicos fueron coincidentes con los descritos para el producto natural aislado, *via* acetilación, del extracto de un cultivo líquido de *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 (ver *Anexo de Espectros*).

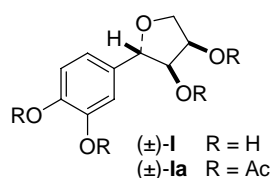


Figura II.7. Estructura propuesta para el metabolito aislado de *Colletotrichum gloeosporioides* 20122.

A continuación se resumen los resultados obtenidos en la síntesis de (\pm)-gloeosporiol, utilizando 3',4'-dihidroxibenzaldehído (**8**) como material de partida.

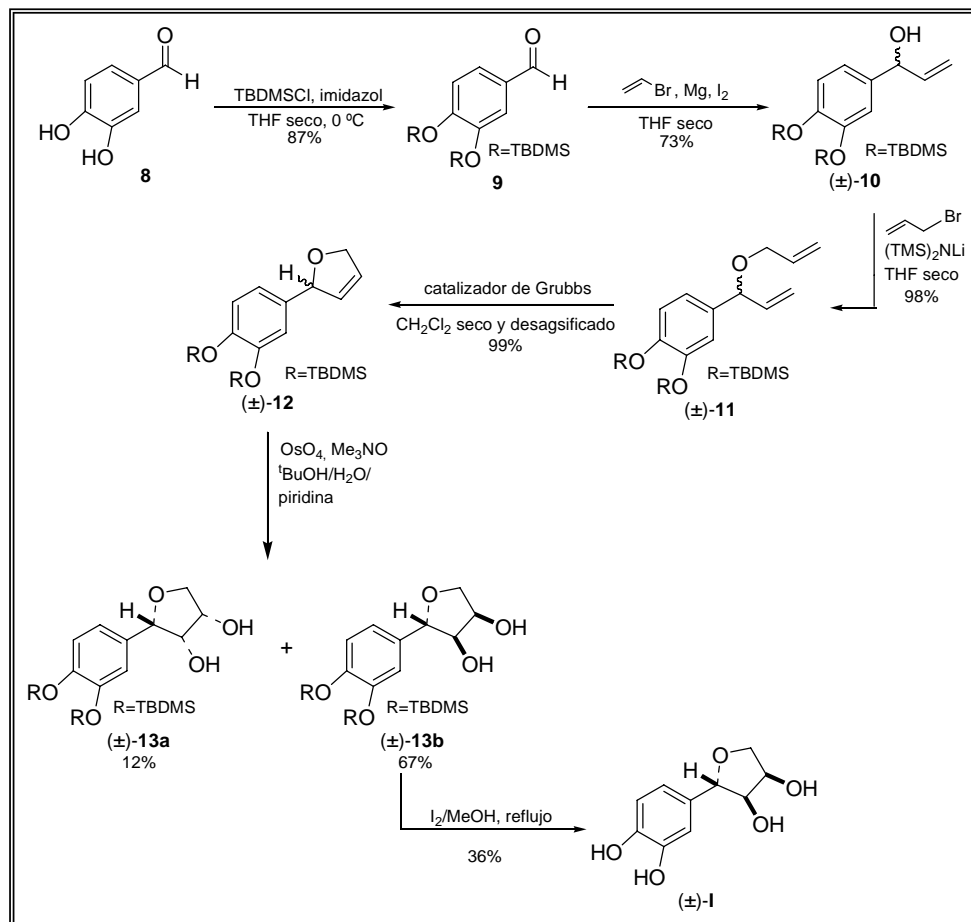
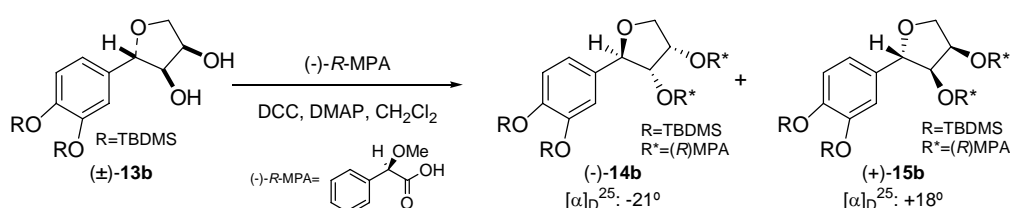


Figura II.8. Secuencia de reacciones desarrollada para la síntesis de (±)-gloeosporiol.

II.3. Resolución de (±)-gloeosporiol.

En este punto de la síntesis, tenemos el compuesto deseado en su forma racémica, aunque el producto natural tetraacetilado ((-)-**1a**) está, cuando menos, enantioméricamente enriquecido, ya que posee actividad óptica ($[\alpha]_D^{25}$ (c=2 mg/mL): -34°). Por lo tanto, la resolución química de (±)-gloeosporiol ((±)-**1**) se presenta como la alternativa más accesible para obtener (-)-**1** enantioméricamente puro.

Así, el primer paso a seguir sería derivatizar la mezcla racémica de los dioles (±)-**13b**, para así obtener compuestos diastereoméricos, separables mediante cromatografía en columna.



El tratamiento de (±)-**13b** con ácido (*R*)-(-)-α-metoxifenilacético, *N*-diciclohexilcarbodiimida y una cantidad catalítica de *N,N*-dimetilaminopiridina en diclorometano, a temperatura ambiente, durante 1 hora, permite obtener dos diésteres diastereoméricos, (-)-**14b** y (+)-**15b**, con rendimientos del 39% y 60%, respectivamente.

En este punto debemos indicar que las stereoquímicas absolutas presentadas en la figura anterior, y en las que siguen en este capítulo (-)-gloeosporiol ((-)-**1**), se derivan del estudio de resolución cinética enzimática y la aplicación de la regla de Kazlauskas, que se discutirán en el apartado III.1.

Compuesto (-)-14b.

El compuesto (-)-**14b** únicamente se diferencia del (±)-**13b** en la desaparición de los dos grupos hidroxilo, que han sido sustituidos por dos restos tipo metoxifenilacetato.

Las señales a δ 3.30 y 3.44 ppm en el espectro de RMN de ¹H del producto, indican la existencia de dos grupos metoxilo en la molécula, que se corresponden, según el experimento de correlación ¹H-¹³C bidimensional gHSQC, con los carbonos a δ 57.2 y 57.3 ppm.

Además, en el espectro de RMN de ^{13}C aparecen dos señales singlete a δ 169.50 y 169.53 ppm, confirmando la presencia de dos grupo carbonilo en la molécula.

En la región aromática del espectro de RMN de ^1H aparecen señales que integran para 13 protones aromáticos, del mismo modo que en el espectro de RMN de ^{13}C también se muestran señales correspondientes a 18 carbonos aromáticos.

Todo esto, unido a que en el espectro de IR la banda característica de grupos hidroxilo ha desaparecido, confirma la formación del compuesto (-)-**14b**.

Compuesto (+)-15b.

Al igual que en el caso anterior, el compuesto (+)-**15b** únicamente se diferencia del (\pm)-**13b** en la desaparición de los dos grupos hidroxilo, que han sido sustituidos por dos restos tipo metoxifenilacetato.

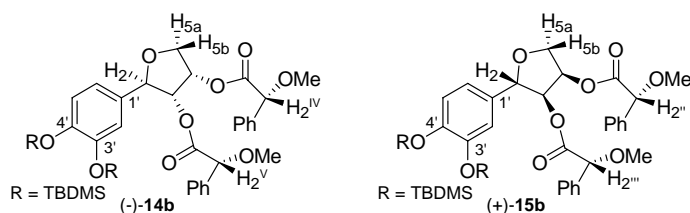
Las señales correspondientes a los grupos metoxilo en este caso aparecen a δ 3.26 y 3.37 ppm, en el espectro de RMN de ^1H .

En el espectro de RMN de ^{13}C , los dos grupos carbonilo aparecen como una única señal a δ 169.5 ppm.

En la región aromática del espectro de RMN de ^1H aparecen señales que integran para 13 protones aromáticos, del mismo modo que en el espectro de RMN de ^{13}C también se muestran señales correspondientes a 18 carbonos aromáticos (3 núcleos tipo fenilo).

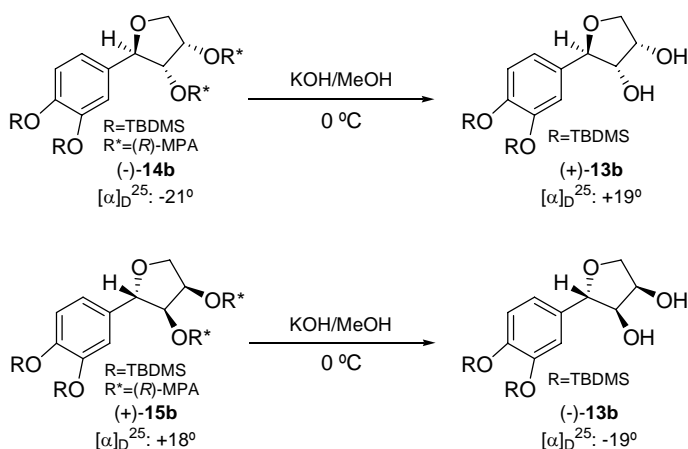
Todo esto, unido a que en el espectro de IR la banda característica de grupos hidroxilo ha desaparecido, confirma la formación del compuesto (+)-**15b**.

En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos químicos de los protones y carbonos de ambos compuesto, para visualizar las diferencias.



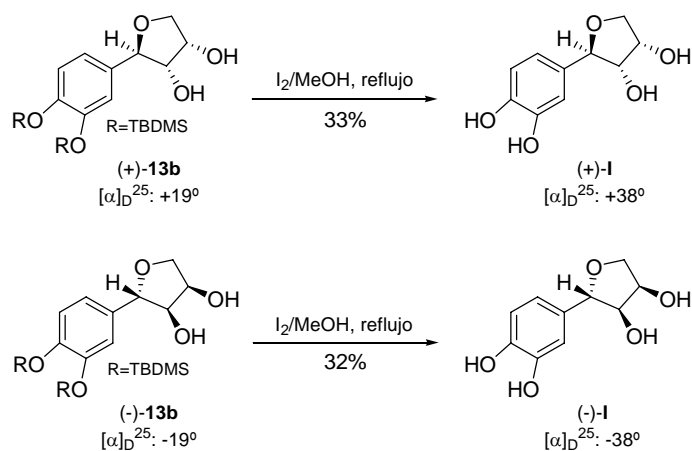
Centro	(-)-14b		(+) -15b	
	¹ H-RMN	¹³ C-RMN	¹ H-RMN	¹³ C-RMN
2	4.50	81.21	4.68	81.2
3	4.94	77.5	5.00	77.5
4	5.51	70.9	5.39	71.0
5	4.00, 4.39	70.7	3.48, 4.25	70.7
OMe	3.30, 3.44	57.2, 57.3	3.26, 3.37	57.2, 57.3
2 ^{IV} , 2 ^V	4.09, 4.84	81.19, 82.2	4.10, 4.80	81.2, 82.2
C=O	-	169.50, 169.53	-	169.5

La hidrólisis básica de estos compuestos, por separado, con KOH/MeOH, a 0 °C, produjo los correspondientes dioles enantioméricos; de modo que el tratamiento de (-)-14b condujo a (+)-13b con un rendimiento del 92%, mientras que el diol (-)-13b se obtuvo a partir del diéster (+)-15b, con un rendimiento del 27%.



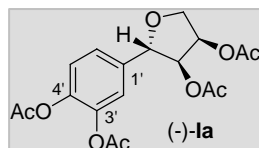
En este punto, la última reacción necesaria para la obtención del producto deseado es la eliminación de los grupos protectores, que se llevó a cabo del mismo modo que en el apartado anterior, mediante el tratamiento de los dioles con I₂/MeOH. Así se

obtuvieron químicamente los tetroles (+)-**I** y (-)-**I**, con rendimientos del 33 y 32%, respectivamente.



Para confirmar que el compuesto (-)-**I** se corresponde con el producto natural aislado de *C. gloeosporioides* 20122, se procedió a su acetilación, lo que permitió obtener un compuesto de idénticas propiedades físicas y espectroscópicas a las del producto natural aislado (-)-**Ia**. Esto, a su vez, confirma que el producto natural aislado es un compuesto enantioméricamente puro.

III. APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS ENANTIOSELECTIVA DE (-)-(2S,3S,4R)-GLOEOSPORIOL ((-)-I). DETERMINACIÓN DE LA ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA DE (-)-I.



El producto natural aislado (-)-**la** posee tres centros quirales, como se aprecia en la figura; la configuración relativa de los átomos de hidrógeno localizados sobre los centros quirales C-2, C-3 y C-4, se analizó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en RMN de ^1H y se confirmó mediante el estudio de efectos n.O.e.

La preparación de los compuestos (\pm)-**13a** y (\pm)-**13b**, el estudio de su estereoquímica y la preparación de (-)-**I** a partir de (\pm)-**13b**, permiten asignar una estereoquímica relativa para (-)-**I**, pero no su estereoquímica absoluta.

Para determinar su estereoquímica absoluta se propone llevar a cabo una síntesis enantioselectiva de (-)-gloeosporiol ((-)-**I**), mediante dos aproximaciones diferentes:

- Inducir la quiralidad en el centro C-2 en las etapas iniciales de la síntesis, para lo que se utilizó la resolución enzimática mediante el uso de lipasas.
- Obtener los centros C-3 y C-4 enantioselectivamente, mediante el uso de resolución cinética *via* dihidroxilación asimétrica de Sharpless.

III.1. Resolución cinética enzimática.

Para llevar a cabo transformaciones regio- y estereoselectivas, las enzimas se han convertido en catalizadores habituales en síntesis orgánica. En particular, las lipasas han recibido la mayor atención, ya que son unos de los biocatalizadores más versátiles, actuando eficientemente en reacciones de acilación e hidrólisis y en procesos de alcoxycarbonilación. En general, estos catalizadores son baratos y, en muchos casos, se adaptan a un amplio rango de sustratos. Además, las lipasas son catalizadores naturales respetuosos con el medio ambiente.⁵¹

⁵¹ Oves, D.; Gotor-Fernández, V.; Fernández, S.; Ferrero, M. and Gotor, V. "Regioselective enzymatic syntheses of C-3 and C-5 carbonate A-ring stereoisomeric precursors of vitamin D". *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2881-2887.

Para la hidrólisis de ésteres, la regla general que gobierna la elección de una lipasa o una esterasa se muestra en la *figura III.1*.⁵² Las esterasas actúan sobre ésteres **tipo I**, y las lipasas trabajan sobre sustratos **tipo II**. Es decir, la hidrólisis o transesterificación de un éster que provenga de un ácido carboxílico quiral y una molécula pequeña de alcohol, puede ser llevada a cabo más eficientemente por una esterasa, mientras que en el caso contrario, es mejor utilizar una lipasa.

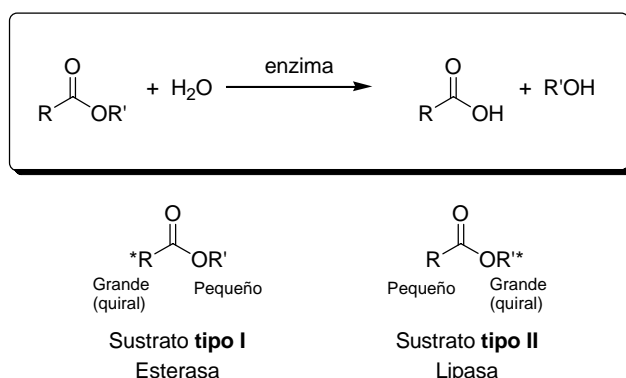


Figura III.1. Hidrólisis de ésteres catalizada por lipasas o esterasas.

Además, el hecho de que la mayoría de las lipasas muestran la misma preferencia estereoquímica para ésteres de alcoholes secundarios, tal y como se observa en la *figura III.2*, es conocido como “regla de Kazlauskas”.⁵³ Esta regla predice con elevada exactitud, para un gran número de alcoholes secundarios, el enantiómero que reacciona más rápidamente con determinadas lipasas; está basada en la diferencia de tamaño de los sustituyentes del alcohol, estableciendo que a mayor diferencia entre ellos, mayor será la selectividad enzimática.

Cuando el enantiómero del alcohol más reactivo se une a la lipasa, el grupo más voluminoso se aloja en el hueco enzimático de mayor tamaño, mientras que el grupo mediano se acomoda en el hueco más pequeño. Para el enantiómero menos reactivo, la

⁵² Lin, G.-Q.; Li, Y.-M. and Chan, A. S. C. Principles and applications of asymmetric synthesis. John Wiley & Sons, **2001**, pp. 452.

⁵³ Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T. and Cuccia, L. A. “A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia* and lipase from *Candida rugosa*”. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665.

situación es la opuesta, ya que su grupo voluminoso debería acoplarse en el hueco pequeño, estando, por ello, desfavorecido. La similitud estructural que presentan la mayoría de lipasas en el hueco nucleofílico del centro activo, permite extender esta regla a muchas de ellas. Sin embargo, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de cada lipasa se manifiestan en una serie de particularidades que determinan la especificidad de sustrato.



Figura III.2. Regla de Kazlauskas.

Asumiendo que el orden de los sustituyentes para asignar la estereoquímica absoluta sea que el sustituyente más voluminoso tenga preferencia sobre el menor, el enantiómero preferido como sustrato **tipo II** posee configuración *R* en el centro alcohólico.

Así, en las resoluciones enzimáticas mediante hidrólisis con lipasas, esperamos obtener el alcohol *R* enriquecido enantioméricamente. De modo análogo, en las esterificaciones con lipasas, el enantiómero que reacciona más rápidamente es el de configuración *R*, por lo que obtendríamos el alcohol no reactivo, de configuración *S*, enriquecido enantioméricamente.

La elección de la lipasa es vital para la enantioselectividad final de la reacción, basándose dicha elección en factores tales como la selectividad y los costes económicos; de ahí, que empleásemos las lipasas de páncreas de cerdo (PPL), de *Candida rugosa* (CRL), de *Pseudomonas fluorescens* (AK) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL, Amano).

En nuestro caso particular, el objetivo por el que utilizamos esta resolución cinética enzimática es obtener el alcohol **10** de forma enantioselectiva, para poder llevar a cabo la síntesis de (-)-gloeosporiol. En principio, desconocemos la configuración absoluta de

10 necesaria para obtener (-)-gloeosporiol, así que decidimos preparar ambos enantiómeros, (-)-**10** y (+)-**10**.

De acuerdo con la regla de Kazlauskas y teniendo en cuenta que nuestro sustrato es de **tipo II**, si utilizamos una reacción de esterificación enzimática, obtendremos el alcohol de configuración absoluta *S*, como material de partida residual; mientras que si la reacción que llevamos a cabo es la de hidrólisis, obtendremos como producto de la reacción el alcohol con configuración absoluta *R* (figura III.3).

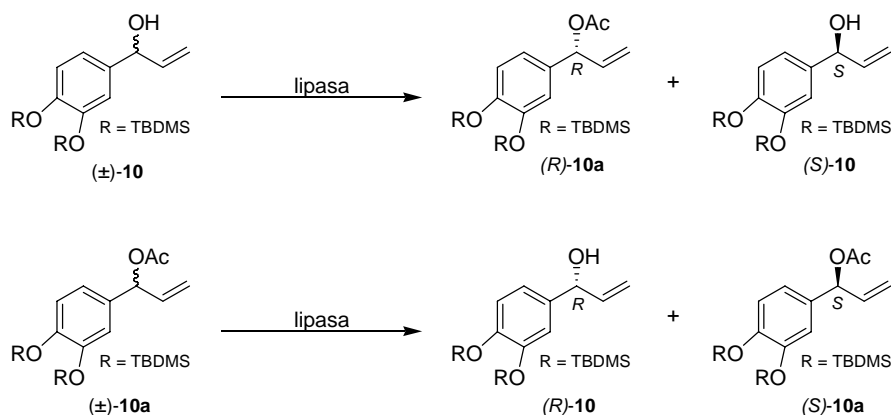


Figura III.3. Esquema resumen de las resoluciones cinéticas enzimáticas.

Hay que indicar que la determinación de los excesos enantioméricos se ha realizado sólo para el caso de los alcoholes (*Parte Experimental, apartados I.1 y I.2*), ya que para los acetatos no ha sido posible su determinación directa.

Así, en la discusión que viene a continuación, sólo se detallan los excesos enantioméricos de los alcoholes obtenidos, tanto como material de partida residual para el caso de las esterificaciones con lipasas, como para el producto de la reacción, para el caso de las hidrólisis.

III.1.1. Resolución cinética mediante acetilación enzimática.

La resolución cinética mediante acetilación enzimática se trata de un proceso en el que un alcohol racémico es resuelto en presencia de una lipasa mediante su reacción selectiva con un éster.⁵⁴

Las lipasas utilizadas en este estudio (PPL, CRL y PSL) catalizan la transferencia del grupo acilo desde enol ésteres, tales como acetato de vinilo o acetato de isopropenilo, a la molécula deseada.

Es importante la elección del disolvente, ya que se pueden provocar cambios sustanciales en la enantioselectividad del proceso, e incluso la inversión de la enantiopreferencia de la enzima. Los mejores resultados se obtienen normalmente con los disolventes más hidrofóbicos, como *t*-butil metil éter (TBME),⁵⁵ aunque existen algunas excepciones.

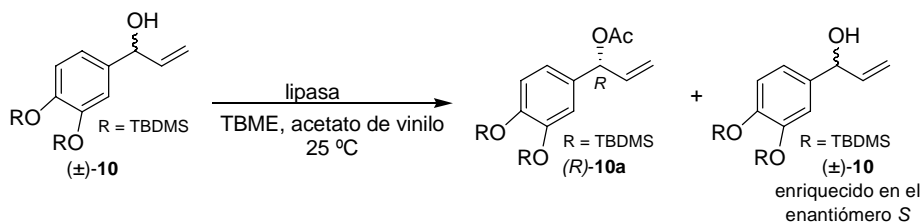
Por último, debemos destacar la importancia del donador de acilo empleado. Así, las reacciones de acilación con ésteres “normales” son generalmente procesos reversibles, debido a la limitada concentración del nucleófilo y la competencia existente alrededor del intermedio acil-enzima, que incluye los dos enantiómeros del alcohol, el grupo saliente del donador de acilo y el agua presente en el medio. Todo ello va a provocar una importante disminución en los excesos enantioméricos de los productos, conduciendo a bajas enantioselectividades. Una solución eficaz es el empleo de ésteres enólicos,⁵⁶ como ésteres de vinilo o isopropenilo, que liberan enoles inestables como subproductos, que se tautomerizan fácilmente para formar acetaldehído y acetona, respectivamente, permitiendo que el proceso sea prácticamente irreversible. No obstante, debido a razones estéricas, los ésteres de vinilo provocan reacciones más rápidas que los de isopropenilo, por lo que en nuestro caso haremos uso del acetato de vinilo.

⁵⁴ Santaniello, E.; Reza-Elahi, S. and Ferraboschi, P. “Chiral synthons by enzymatic acylation and esterification reactions”. *Stereoselective Biocatalysis* **2000**, 415-460.

⁵⁵ Nakamura, K.; Kinoshita, M. and Ohno, A. “Effect of solvent on lipase-catalyzed transesterification in organic media”. *Tetrahedron* **1994**, 50, 4681-4690.

⁵⁶ Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongan, M.; Bergbreiter, D. E. and Wong, C. H. “Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics”. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 110, 7200-7205.

Algunos resultados se describen en la *tabla III.1*, en la que se detallan las lipasas empleadas en el presente trabajo.



Entrada	Lipasa	Condiciones de reacción	Acetato (Rto.)	Alcohol recuperado ^a	
				Rto.	ee ^b
1	PPL	TBME, acetato de vinilo, 6 días, 25 °C	-	-	-
2	CRL	TBME, acetato de vinilo, 6 días, 25 °C	-	-	-
3	PSL ⁵⁷	TBME, 1 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 24 h	12%	46%	3%
4	PSL ⁵⁷	TBME, 1 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 48 h	39%	42%	3%
5	PSL ⁵⁸	TBME, 10 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 24 h	5%	91%	9%
6	PSL ⁵⁸	TBME, 10 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 48h	7%	87%	13%

a) Enriquecido en el enantiómero S; b) exceso enantiomérico determinado por HPLC.

Tabla III.1. Resolución cinética *via* acetilación enzimática del alcohol (±)-10.

De acuerdo con estos resultados, se obtuvo un enriquecimiento enantiomérico en el alcohol (S)-10 únicamente cuando la reacción de esterificación del alcohol (±)-10 se lleva a cabo utilizando la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, a pesar de que los excesos enantioméricos que se obtienen son muy bajos, por lo que este material no puede ser utilizado en la preparación enantioselectiva de (-)-I.

⁵⁷ Nakano, S.; Igarashi, Y. and Nohira, H. "Lipase-mediated kinetic resolution of cis-1,2-indandiol and the Ritter reaction of its mono-acetate". *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 59-62.

⁵⁸ López-García, M.; Alfonso, I. and Gotor, V. "Highly efficient biocatalytic resolution of *cis*- and *trans*-3-aminoindan-1-ol: Syntheses of enantiopure orthogonally protected *cis*- and *trans*-indane-1,3-diamine". *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3006-3014.

III.1.2. Resolución cinética mediante hidrólisis enzimática.⁵⁹

Las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Además de su importancia biológica, juegan un papel muy importante en biotecnología, no sólo para el procesamiento de alimentos y aceites, sino también para la preparación de intermedios quirales. Aunque pueden llevar a cabo reacciones de hidrólisis y esterificaciones, como las proteasas y las esterasas, su mecanismo molecular es diferente, lo que les confiere unas propiedades únicas.

La diferencia más importante entre lipasas y esterasas es la interacción físico-química con sus sustratos. En contraste con las esterasas, que presentan una actividad “normal” tipo Michaelis-Menten, dependiente de la concentración de sustrato, las lipasas no muestran apenas actividad mientras el sustrato se encuentra en un estado monomérico disuelto (*figura III.4*). Sin embargo, cuando la concentración de sustrato aumenta, más allá de su límite de solubilidad, se produce un aumento drástico en la actividad de la enzima. El hecho de que las lipasas no hidrolicen sustratos por debajo de una concentración crítica, pero que sean muy activas una vez superada ésta, recibe el nombre de “activación interfacial”.

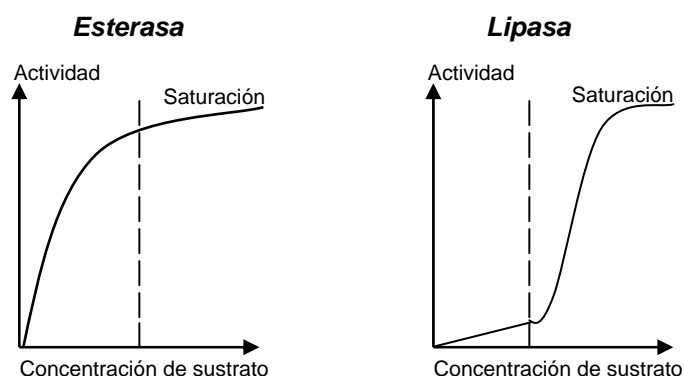


Figura III.4. Cinética de las hidrólisis catalizadas por esterasas y lipasas.

⁵⁹ “Biotransformations in Organic Chemistry - A textbook- 3rd edition” K. Faber. Springer, **1997**.

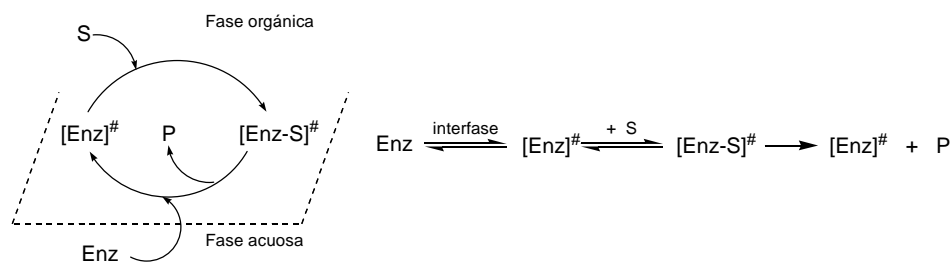


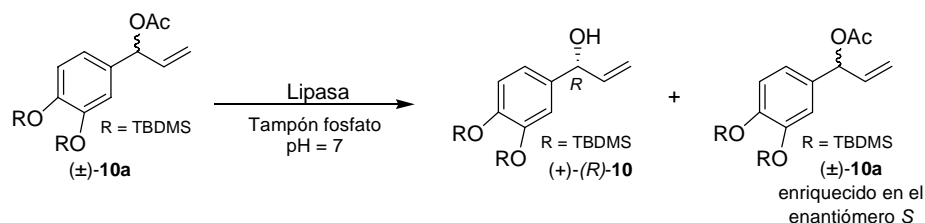
Figura III.5. Mecanismo de “activación interfacial”.

El razonamiento molecular para este fenómeno reside en un proceso de reorganización dentro de la enzima. Una lipasa disuelta en ausencia de una interfase acuosa-orgánica permanece en un estado inactivo, con una parte de la molécula de enzima bloqueando su centro activo. Cuando la enzima entra en contacto con la interfase de un sistema bifásico agua-“aceite”, se produce un cambio estructural que origina la apertura del centro activo, es decir, la lipasa se reordena hacia su estado activo.

En consecuencia, las hidrólisis catalizadas por lipasas deben ser llevadas a cabo en un medio bifásico. Es suficiente utilizar concentraciones muy elevadas de sustrato, de tal modo que él mismo constituya la segunda fase orgánica, o, alternatively, se puede disolver en una mezcla formada por agua y un disolvente orgánico inmiscible, como hexano, dialquil éter, o un líquido aromático. Debido a la presencia de una interfase, los parámetros físicos que influyan en la transferencia de masa de sustrato y producto entre la fase acuosa y la orgánica, tales como la velocidad de agitación, tienen un importante efecto en la velocidad de reacción de las lipasas.

Debido a las razones antes descritas, está claro que la adición a las reacciones catalizadas por lipasas de disolventes orgánicos inmiscibles en agua es una técnica útil para mejorar su actividad catalítica.

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo la hidrólisis del acetato racémico (\pm)-**10a**, catalizada por diferentes lipasas, bajo distintas condiciones de reacción, tal y como se detalla en la *tabla III.2*.



Lipasa	Condiciones de reacción	Resultado
CRL	1,4-dioxano, agua, 24 h.	No reacciona
AK ⁶⁰	Isopropanol, agua, 96 h.	No reacciona
AK ⁶⁰	Acetonitrilo, agua, 96 h.	No reacciona
PSL	1,4-dioxano, agua, 24 h.	Sí reacciona

Tabla III.2. Lipasas utilizadas en la resolución cinética *via* hidrólisis del acetato (±)-10a.

Debido a que sólo funcionó la hidrólisis cuando se utilizó la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, decidimos llevar a cabo un proceso de optimización de las condiciones de reacción, para así conseguir el alcohol (+)-(R)-10 con un buen rendimiento y un buen exceso enantiomérico. Así, se probaron distintas condiciones de reacción, en las que se variaron la temperatura y el tiempo de reacción.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes tablas.

⁶⁰ Yoshida, N.; Aono, M.; Tsubuki, T.; Awano, K. and Kobayashi, T. "Enantioselective synthesis of a chiral pyridazinone derivative by lipase-catalyzed hydrolysis". *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 529-535.

Entrada	Tiempo	T (°C)	Acetato recuperado (Rto.)	Alcohol R	
				Rto.	ee ^a
1	1 h	37 °C	83%	17%	86%
2	2 h	37 °C	75%	14%	94%
3	2.5 h	37 °C	70%	18%	94%
4	3 h	37 °C	36% ⁶¹	19%	79%
5	2.5 h	48 °C	81%	9%	81%
6	3 h	48 °C	51%	7%	93%
7	3.5 h	48 °C	75%	10%	88%

a) Exceso enantiomérico determinado por HPLC.

Tabla III.3. Proceso de optimización de la resolución cinética *via* hidrólisis enzimática del acetato (±)-**10a**.

Entrada	Tiempo	T (°C)	Acetato recuperado (Rto.)	Alcohol R	
				Rto.	ee
1	3 h	25 °C	75%	19%	96% ^a
2	5 h	25 °C	74%	19%	96% ^a
3	6 h	25 °C	53%	34%	98% ^a
4	9 h	25 °C	25% ⁶¹	24%	98% ^a
5	24 h	25 °C	13% ⁶¹	29%	73% ^b

a) Exceso enantiomérico determinado por HPLC; b) exceso enantiomérico determinado por RMN.

Tabla III.4. Proceso de optimización de la resolución cinética *via* hidrólisis enzimática del acetato (±)-**10a**.

Un ejemplo de cromatograma para la determinación del exceso enantiomérico del alcohol (+)-(*R*)-**10** es el que se muestra en la *figura III.6*, en el que se pueden apreciar los picos correspondientes a cada uno de los enantiómeros, a 51 y 54 minutos, siendo el ee del 98% (ver *tabla III.4*, entrada 3).

⁶¹ El bajo rendimiento obtenido para el acetato recuperado fue atribuido a la degradación del compuesto en el gel de sílice durante su purificación cromatográfica. No se observó degradación en el alcohol.

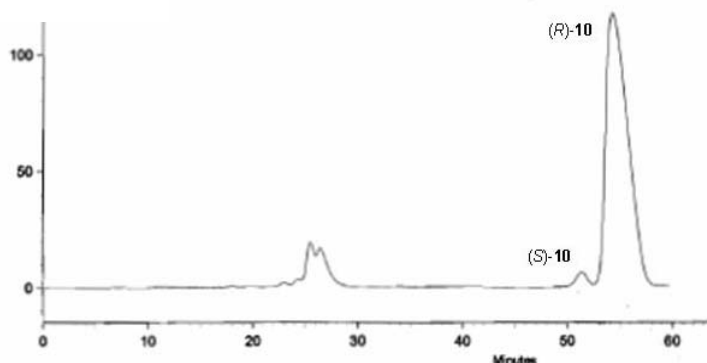


Figura III.6. Cromatograma de (+)-(*R*)-**10**, obtenido *via* hidrólisis enzimática con la lipasa PS de Amano.

Se han probado numerosas condiciones de reacción (tiempo y temperatura) para determinar el mejor modo de obtener el alcohol (+)-(*R*)-**10**; en casi todos los casos, hemos obtenido buenos excesos enantioméricos, aunque los rendimientos normalmente han sido bajos. Únicamente, llevando a cabo la reacción de hidrólisis a temperatura ambiente, durante 6 horas, obtuvimos el alcohol (+)-(*R*)-**10** con un rendimiento aceptable (34%) y un buen exceso enantiomérico (98%).⁶²

Tal y como puede observarse, los resultados obtenidos mediante las acetilaciones no son buenos, ya que los excesos enantioméricos para el alcohol residual, (-)-(*S*)-**10**, son muy bajos. En cambio, en el caso de las hidrólisis, el alcohol (+)-(*R*)-**10** se obtiene con un rendimiento aceptable y un excelente exceso enantiomérico.

⁶² $[\alpha]_D^{25}$ c=2 mg/mL MeOH): +3°.

III.2. Resolución cinética via dihidroxilación asimétrica de Sharpless.^{63,64}

La dihidroxilación asimétrica de olefinas constituye una poderosa herramienta para generar dioles vecinales ópticamente activos. El sistema catalítico desarrollado por Sharpless ha sido aplicado para la dihidroxilación asimétrica de un amplio rango de sustratos;⁶⁵ consiste en la reacción entre un alqueno y tetróxido de osmio en presencia de un ligando quinina quiral, para formar un diol mediante una adición 1,2-*syn* enantioselectiva.

Esta reacción se lleva a cabo utilizando cantidades catalíticas de tetróxido de osmio, que es regenerado por la acción de un segundo oxidante (habitualmente ferricianuro potásico o *N*-óxido de *N*-metilmorfolina), de forma que se reduce drásticamente la cantidad necesaria de OsO₄, altamente tóxico y muy caro.

En la actualidad se dispone comercialmente de dos mezclas de reactivos para el desarrollo de la dihidroxilación asimétrica de olefinas de Sharpless: ADmix α y ADmix β . Ambos se diferencian únicamente en el ligando quinina quiral que incluyen.⁶⁴

- ADmix α : K₂OsO₂·2H₂O, K₃Fe(CN)₆, K₂CO₃ y (DHQ)₂PHAL (ligando quiral).
- ADmix β : K₂OsO₂·2H₂O, K₃Fe(CN)₆, K₂CO₃ y (DHQD)₂PHAL (ligando quiral).

A modo de resumen, podemos describir algunas de las características más importantes de la dihidroxilación asimétrica catalítica:⁶⁶

- i. La reacción es estereoespecífica, obteniéndose una adición 1,2-*syn* de los dos grupos hidroxilo al doble enlace.

⁶³ Spivey, A. C.; Hanson, R.; Scoriah, N. and Thorpe, S. J. "Asymmetric Dihydroxylation: Effect of Alkene Structure on Rates and Selectivity". *Journal of Chemical Education* **1999**, *76*, 655-659.

⁶⁴ Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K.; Sung, K.; Hoi, L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M.; Xu, D.; Zhang, X. -L. "The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement". *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.

⁶⁵ Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S. and Sharpless, K. B. "Catalytic asymmetric dihydroxylation". *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483-2547.

⁶⁶ Becker, H. and Sharpless, K. B. Asymmetric dihydroxylation. In Katsuki, T. [Ed.] *Asymmetric oxidation reactions*. **2001** Oxford University Press, pp. 81-104.

- ii. La reacción no requiere la presencia de ningún grupo director para conseguir altos excesos enantioméricos. La mayoría de las olefinas reaccionan en este proceso.
- iii. Normalmente ocurre con una alta quimioselectividad y enantioselectividad.
- iv. La selectividad de cara se puede predecir usando una sencilla “regla mnemotécnica”; las excepciones son poco frecuentes y cuando que se observan, los excesos enantioméricos que se alcanzan son bajos.

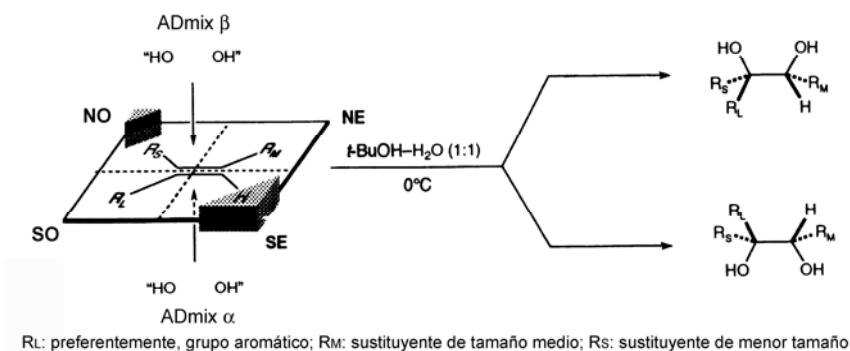
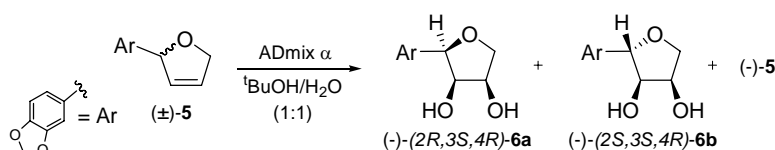


Figura III.7. “Regla mnemotécnica”.

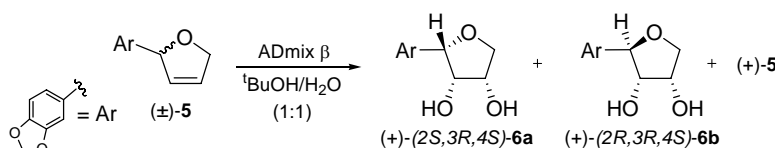
La reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless será aplicada en este punto con el objeto de llevar a cabo una resolución cinética⁶⁷ del dihidrofurano racémico (\pm)-**12**, que debería originar el diol (-)-(2S,3S,4R)-**13b** enantioméricamente enriquecido, tal y como se necesita para la síntesis enantioselectiva de (-)-**I** (*apartado III.3*). Previamente, esta reacción fue ensayada sobre la olefina racémica (\pm)-**5**, como sistema modelo. Los resultados se resumen a continuación.

⁶⁷ VanNieuwenhze, M. S. and Sharpless, K. B. “Kinetic resolution of racemic olefins via asymmetric dihydroxylation”. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7864-7865.



Condiciones de reacción	(-)-5		(-)-(2R,3S,4R)-6a			(-)-(2S,3S,4R)-6b		
	Rto.	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee*	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee*	$[\alpha]_D^{25}$
ADmix α, oscuridad, 0 °C, 4h.	29%	-9°	5%	68%	-63°	9%	79%	-44°
ADmix α, oscuridad, 0 °C, 5h.	44%	-14°	11%	50%	-46°	23%	77%	-43°

* Los excesos enantioméricos fueron determinados por HPLC, a partir de los correspondientes diacetatos, tal y como se describe en la *Parte Experimental*, apartado I.2.



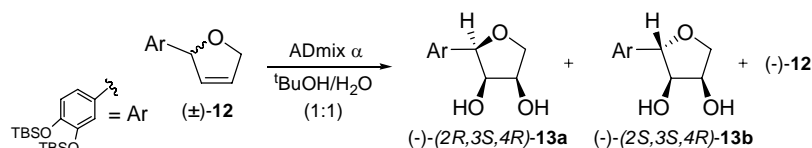
Condiciones de reacción	(±)-5		(+)-(2S,3R,4S)-6a			(+)-(2R,3R,4S)-6b		
	Rto.	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee*	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee*	$[\alpha]_D^{25}$
ADmix β, oscuridad, 0 °C, 5h.	40%	+8°	5%	57%	+28°	9%	65%	+24°

* Los excesos enantioméricos fueron determinados por HPLC, a partir de los correspondientes diacetatos, tal y como se describe en la *Parte Experimental*, apartado I.2.

Como se observa en las tablas anteriores, la diastereoselectividad de la reacción es baja ((-)-**6a**:(-)-**6b** = 11:23; (+)-**6a**:(+)-**6b** = 5:9), especialmente cuando se compara con la obtenida al utilizar el sistema de reactivos OsO₄/NMO (*apartado II.1.2*). Por otro lado, aunque el signo de la rotación óptica obtenido cuando se utiliza ADmix α es el correcto, el exceso enantiomérico para el compuesto (-)-**6b**⁶⁸ no supera un 80%. Este exceso enantiomérico ya ha sido obtenido mediante la resolución enzimática, tal y como se describió anteriormente.

De todos modos, se ha llevado a cabo la resolución cinética de (±)-**12** *via* dihidroxilación asimétrica de Sharpless, empleando un tiempo de reacción extendido.

⁶⁸ Las estereoquímicas absolutas han sido asignadas mediante la aplicación de la regla mnemotécnica para predecir la selectividad de cara.



Condiciones de reacción	(-)-12		(-)-(2R,3S,4R)-13a			(-)-(2S,3S,4R)-13b		
	Rto.	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee	$[\alpha]_D^{25}$	Rto.	ee*	$[\alpha]_D^{25}$
ADmix α , oscuridad, 0 °C, 24h.	36%	-3°	14%	-	-7°	22%	47%	-9°

* El exceso enantiomérico fue calculado como pureza óptica.⁶⁹

Tal y como se observa en la anterior tabla, el signo correcto para la rotación óptica fue obtenido para los alcoholes (-)-(2R,3S,4R)-13a y (-)-(2S,3S,4R)-13b, cuando se utilizó el reactivo ADmix α , aunque el ee fue bajo (47%). Por tanto, la metodología que emplea la resolución enzimática fue preferida para llevar a cabo la síntesis enantioselectiva de (-)-I.

III.3. Síntesis de (-)-(2S,3S,4R)-gloeosporiol ((-)-I).

Con el objeto de aplicar la metodología propuesta en el apartado II.2, utilizamos el alcohol (+)-(R)-10, obtenido *via* hidrólisis enzimática, como material de partida.⁷⁰

La O-alilación de (+)-(R)-10 permitió obtener el éter (+)-(R)-11;⁷¹ la metátesis de cierre de anillo de esta olefina originó el compuesto (+)-(R)-12.⁷²

La dihidroxilación de este derivado de dihidrofurano, (+)-(R)-12, con el sistema OsO₄/NMO, y la posterior purificación mediante cromatografía en columna, nos permitió obtener el compuesto (+)-(2S,3R,4S)-13a y el diol mayoritario (-)-(2S,3S,4R)-13b, con un exceso enantiomérico del 79%.⁷³

⁶⁹ El exceso enantiomérico del diol (-)-13b está calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D$: -19° (Apartado II.3)).

⁷⁰ 80% e.e., $[\alpha]_D^{25}$ (c=1.4 mg/mL MeOH) +2.2°.

⁷¹ $[\alpha]_D^{25}$ (c=0.9 mg/mL MeOH): +18.2°.

⁷² $[\alpha]_D^{25}$ (c=0.3 mg/mL MeOH): +40.3°.

⁷³ Calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D^{25}$ (c=1.7 mg/mL MeOH): -14.5°; $[\alpha]_D$: -19° (Apartado II.3)).

La desprotección final del diol (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-**13b** con I₂/MeOH, condujo al compuesto deseado (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-gloeosporiol ((-)-**I**), con un exceso enantiomérico del 79%.⁷⁴

Los resultados obtenidos en la síntesis enantioselectiva de (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-gloeosporiol ((-)-**I**) se resumen en la *figura III.8*.

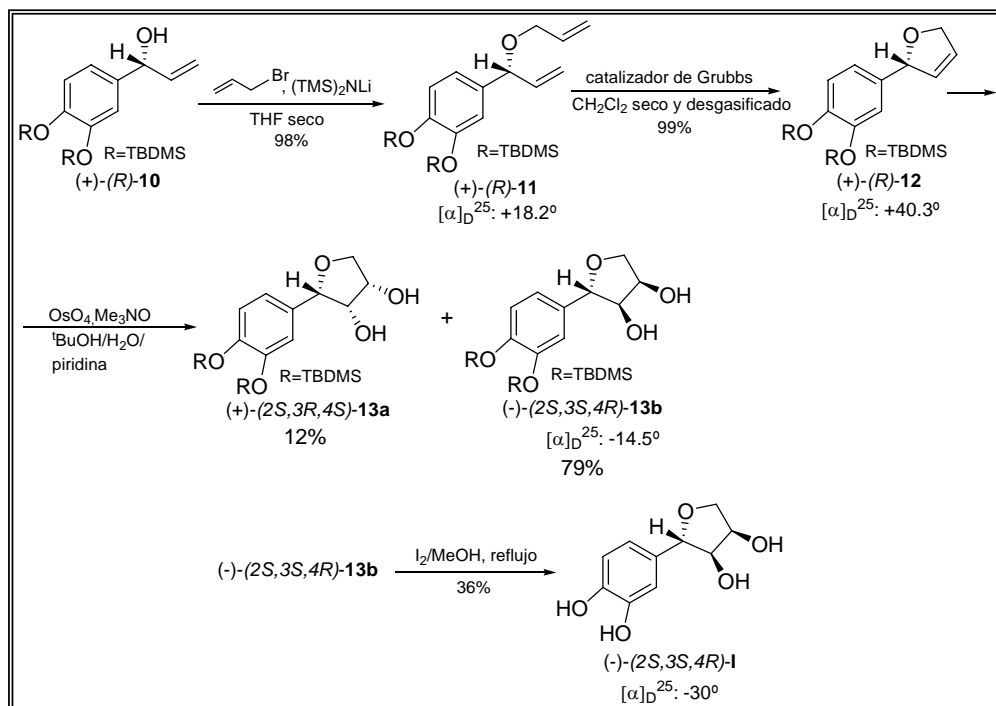


Figura III.8. Síntesis de (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-gloeosporiol ((-)-**I**).

Este procedimiento se realizó sin pérdida de pureza enantiomérica, ya que el exceso enantiomérico del compuesto final ((-)-**I**, ee 79%) es prácticamente idéntico al del material de partida enantioméricamente enriquecido ((+)-(R)-**10**, ee 80%).

⁷⁴ Calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D^{25}$ (c=2 mg/mL MeOH): -30°; $[\alpha]_D^{25}$: -38° (*Apartado II.3*)).

IV. NUEVOS MODELOS DE FUNGICIDAS. SÍNTESIS DE AMINOALCOHOLES MEDIANTE APERTURA REGIOSELECTIVA DE (±)-ÓXIDO DE ESTIRENO CON AMINAS, CATALIZADA POR TRIFLATO DE ESTAÑO (II).

La funcionalización tipo β -aminoalcohol se encuentra presente en un numeroso grupo de compuestos. En la bibliografía se pueden encontrar tres grupos generales de aminoalcoholes vecinales: productos naturales, moléculas sintéticas farmacológicamente activas y ligandos empleados en catálisis.

Generalmente, la presencia de esta funcionalización y la estereoquímica relativa y/o absoluta juegan un papel importante en la actividad biológica de las moléculas que contienen un aminoalcohol vecinal en su estructura.

Se ha aislado una amplia variedad de compuestos con la funcionalización β -aminoalcohol de fuentes naturales, los cuales presentan un amplio espectro de actividades biológicas. Entre ellos destacan los hidroxiaminoácidos, tanto por su actividad biológica como por su utilidad en síntesis asimétrica,⁷⁵ como por ejemplo el dipéptido bestatin (*figura IV.1*).⁷⁶ Otro de los grupos más importantes lo constituyen las moléculas lipídicas, como es el caso de la esfingosina (*figura IV.1*).⁷⁷ Los aminoalcoholes cíclicos, en los que el grupo amino del aminoalcohol vecinal forma parte de un anillo, también constituyen un numeroso grupo de productos naturales con actividad biológica, como por ejemplo penaresidina A (*figura IV.1*).⁷⁸ Los azúcares son otras de las moléculas que pertenecen a este grupo de compuestos. La mayoría de los azúcares con

⁷⁵ Coppola, G. M. and Schuster, H. F. "Asymmetric synthesis. Construction of chiral molecules using amino acids". Wiley: New York, **1987**.

⁷⁶ Bergmeier, S. C. and Stanchina, D. M. "Acynitrene Route to Vicinal Amino Alcohols. Application to the Synthesis of (-)-Bestatin and Analogs". *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2852-2859.

⁷⁷ Koskinen, P. M. and Koskinen, A. M. P. "Sphingosine , an enigmatic lipid. A review of recent literature syntheses". *Synthesis* **1998**, *8*, 1075-1081.

⁷⁸ Kobayashi, J.; Cheng, J.-F.; Ishibashi, M.; Walchii, M. R. and Yamamura, S. "Penaresidin A and B. Two novel azetidine alkaloids with potent actomyosin ATPase-activating activity from the Okinawan marine sponge *Penares* sp". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, *5*, 1135-1137.

la funcionalización β -aminoalcohol son componentes de moléculas mayores, como las agliconas u otros azúcares, como es el caso de elsamicina A (*figura IV.1*).⁷⁹

Muchas de las moléculas sintéticas utilizadas como medicamentos o agentes farmacológicos también contienen aminoalcoholes vecinales en su estructura. A menudo, estos compuestos son análogos de productos naturales que también presentan esta funcionalización. Entre los más conocidos destacan los análogos de péptidos, como por ejemplo saquinavir, inhibidor de la HIV-proteasa (*figura IV.2*).⁸⁰ La presencia del aminoalcohol vecinal en estas moléculas es esencial para su actividad farmacológica.

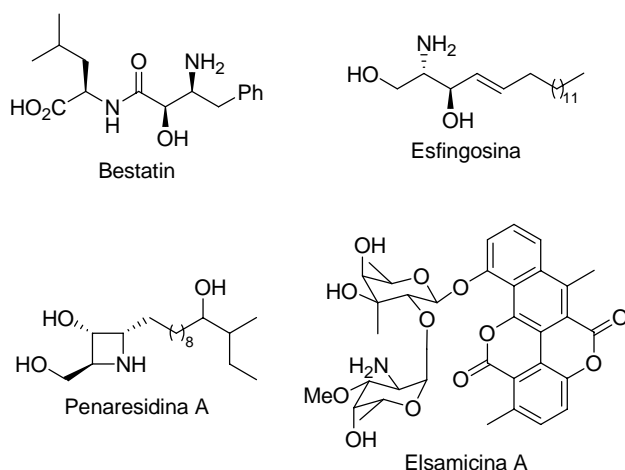


Figura IV.1. Ejemplos de productos naturales con la funcionalización β -aminoalcohol.

⁷⁹ Sugawara, H.; Tsunakawa, M.; Konishi, M.; Kawaguchi, H.; Krishnan, B.; Cun-heng, H. and Clardy, J. "Elsamicins A and B, new antitumor antibiotics related to chartreusin. 2. Structures of elsamicins A and B". *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 996-1001.

⁸⁰ Ohta, Y. and Shinkai, I. "New drugs - Reports of new drugs recently approved by the FDA: saquinavir". *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 465-466.

Un gran número de reactivos quirales utilizan aminoalcoholes enantioméricamente puros como ligandos o auxiliares quirales (*figura IV.3*),⁸¹ entre los que destacan los “auxiliares de Evans”, las oxaborolidinas y los derivados de la efedrina.

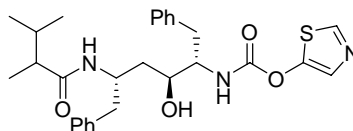


Figura IV.2. Saquinavir.

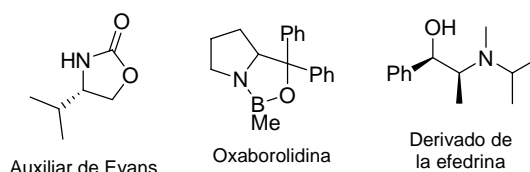


Figura IV.3. Aminoalcoholes utilizados como auxiliares quirales.

La ruta clásica para la preparación de estos compuestos es la aminólisis directa de 1,2-epóxidos;⁸² sin embargo, estas reacciones, que normalmente se llevan a cabo con grandes excesos de amina a elevadas temperaturas, a menudo fracasan cuando se trata de aminas poco nucleofílicas o epóxidos estéricamente impedidos. Se han publicado modificaciones de los procedimientos clásicos, como, por ejemplo, el uso de amidas metálicas (Al,⁸³ Mg,⁸⁴ Li,⁸⁵ Pb,⁸⁶ Sn⁸⁷ y Si⁸⁸), ácidos de Lewis o sales de litio,⁸⁹ algunos de ellos con contra-aniones poco nucleofílicos.⁹⁰

⁸¹ Ager, D. J.; Prakash, I. and Schaad, D. R. “1,2-Amino Alcohols and Their Heterocyclic Derivatives as Chiral Auxiliaries in Asymmetric Synthesis”. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 835-875.

⁸² (a) Möller, F. In *Methoden der Organischen Chemie (Houben- Weyl)*; Müller, E., Ed., 4th ed.; Thieme Verlag: Stuttgart, **1957**; Vol. 11/1, pp. 311-326; (b) Mousseron, M.; Jullien, J. and Jolchine, Y. “Alicyclic series. XXXIV. Preparation and properties of substituted amines”. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1952**, 757-766.

⁸³ Overman, L. E. and Flippin, L. A. “Facile aminolysis of epoxides with diethylaluminum amides”. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 195-198.

⁸⁴ Carré, M. C.; Houmounou, J. P. and Caubère, P. “A convenient preparation of β -amino alcohols from epoxides and halomagnesium alkylamides”. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3107-3110.

⁸⁵ Kissel, C. L. and Rickborn, B. “Base-induced rearrangement of epoxides. IV. Reaction of cyclohexene oxide with various lithium alkylamides”. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2060-2063.

Muchos reactivos han mostrado una consistente regioselectividad en la apertura, conduciendo al ataque sobre el carbono más sustituido o que se encuentre en una posición bencílica o alílica. Para el óxido de estireno, existe una tendencia general de ataque regioselectivo en la posición bencílica cuando se emplean aminas aromáticas.^{89c,90a} Las aminas alifáticas suelen presentar un ataque preferencial sobre la posición no bencílica y no sustituida del anillo de oxirano del óxido de estireno, con un menor grado de regioselectividad.^{89b,90a,90d}

Por otro lado, algunos reactivos favorecen el ataque de aminas aromáticas sobre oxiranos, pero no muestran reactividad con aminas alifáticas.^{89a, 89d,90c}

Las estrategias basadas en el control del hongo con fungicidas clásicos producen graves efectos colaterales, principalmente relacionados con la contaminación ambiental y el desarrollo de multirresistencias, con lo que en la actualidad se está prestando una gran atención a los estudios encaminados a la obtención de fungicidas racionales que no

⁸⁶ Yamada, J.-I.; Yumoto, M. and Yamamoto, Y. "Aminolead compounds as a new reagent for regioselective ring opening of epoxides". *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4255-4258.

⁸⁷ Fiorenza, M.; Ricci, A.; Taddei, M. and Tassi, D. "Regiospecific conversion of oxiranes into primary alcohols via reaction with organotin derivatives". *Synthesis* **1983**, 640-641.

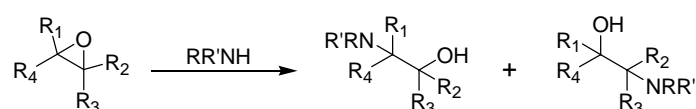
⁸⁸ Papini, A.; Ricci, A.; Taddei, M.; Seconi, G. and Dembech, P. "Regiospecific conversion of oxiranes, oxetanes, and lactones into difunctional nitrogen compounds via aminosilanes and aminostannanes". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 2261-2265.

⁸⁹ (a) Chandrasekhar, S.; Ramachandar, T. and Prakash, S. J. "TaCl₅-catalyzed cleavage of epoxides with aromatic amines". *Synthesis* **2000**, 1817-1818; (b) Chakraborti, A. K. and Kondaskar, A. "ZrCl₄ as a new and efficient catalyst for the opening of epoxide rings by amines". *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8315-8319; (c) Sabitha, G.; Kiran Kumar Reddy, G. S.; Bhaskar Reddy, K. and Yadav, J. S. "Vanadium(III) chloride-catalyzed preparation of β -amino alcohols from epoxides". *Synthesis* **2003**, 2298-2300; (d) Eshghi, H.; Rahimizadeh, M. and Shoryabi, A. "Microwave-assisted cleavage of epoxides with amines in the presence of the catalytic Zn(OAc)₂/1,7-bis(2-benzoic acid)-1,4,7-trioxheptane (ZnBBATOH)". *Synthetic Commun.* **2005**, 35, 791-798.

⁹⁰ (a) Chini, M.; Crotti, P. and Macchia, F. "Regioalternating selectivity in the metal salt catalyzed aminolysis of styrene oxide". *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5939-5942; (b) Meguro, M.; Asao, N. and Yamamoto, Y. "Ytterbium triflate and high pressure-mediated ring opening of epoxides with amines". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 2597-2601; (c) Sekar, G. and Singh, V. K. "An Efficient Method for Cleavage of Epoxides with Aromatic Amines". *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 287-289; (d) Placzek, A.T.; Donelson, J. L.; Trivedi, R.; Gibbs, R. A. and De, S. K. "Scandium triflate as an efficient and useful catalyst for the synthesis of β -amino alcohols by regioselective ring opening of epoxides with amines under solvent-free conditions". *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 9029-9034.

se incorporen a la cadena alimentaria y que sean fácilmente degradables. Así, en la búsqueda de nuevos modelos de fungicidas para el control de la antracnosis y de la podredumbre gris nos basaremos en la experiencia obtenida por nuestro grupo de investigación en el diseño de fungicidas, concretamente en el caso de análogos a fitoalexinas,⁹¹ como los clorofenilpropanoides,⁹² o aminoalcoholes con esqueleto de clovano⁹³ que han mostrado actividad fungiestática contra el hongo *Botrytis cinerea*.⁹⁴

En el presente capítulo se ha iniciado el estudio de la apertura regioselectiva de óxido de estireno con aminas aromáticas y alifáticas, catalizada por triflato de estaño (II), para la preparación de β-aminoalcoholes, estudiando la influencia del disolvente en la reactividad y regioselectividad del proceso.



En la *tabla IV.1* y en la *tabla IV.2* se detallan las condiciones específicas para las aminas empleadas en la apertura de (±)-óxido de estireno.

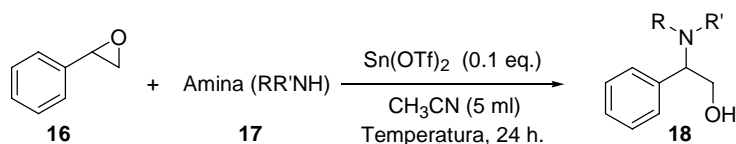
En estudios anteriores, se ha descrito que la apertura de *meso*-epóxidos catalizada por Sn(OTf)₂ únicamente funcionaba con aminas aromáticas, y fallaba con aminas alifáticas.^{90c} Como se deduce de nuestro estudio, este comportamiento desigual entre aminas aromáticas y alifáticas depende del disolvente utilizado.

⁹¹ (a) Jeandet, P.; Bessis, R. "Morphological and biochemical mechanisms of vine-*Botrytis* interactions". *Bulletin de L'O.I.V.* **1989**, 703, 637-657; (b) Kokubun, T.; Harborne, J. B.; Eagles, J. "2',6'-Dihydroxy-4'-methoxyacetophenone, a phytoalexin from the roots of *Sanguisorba minor*". *Phytochemistry* **1994**, 35, 331-333; (c) Echeverri, F.; Torres, F.; Quiñones, W.; Cardona, G.; Archbold, R.; Roldán, J.; Brito, I.; Luis, J. G.; Lahlou, E. H. "Danielone, a phytoalexin from papaya fruit". *Phytochemistry* **1997**, 44, 255-256.

⁹² Bustillo, A. J.; Aleu, J.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. G. "Biocatalytically assisted preparation of antifungal chlorophenylpropanols". *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1681-1686.

⁹³ Macias-Sanchez, A. J.; Amigo, C. F. D. and Collado, I. G. "Tin triflate catalysed selective synthesis of N,N'-unsymmetrically substituted N-(hydroxyclovanil)-N'-aryl acetamidines". *Synlett* **2003**, 1989-1992.

⁹⁴ (a) Gonzalez Collado, Isidro; Hanson, James Ralph and Macias Sanchez, Antonio Jose. "Preparation of agrochemical fungicides active against fungi of the genus *Botrytis*." Span. (2001), 12 pp. CODEN: SPXXAD ES 2154185 A1 20010316 CAN 135:195688; (b) Gonzalez, Collado Isidro; Macias, Sanchez Antonio Jose and Diaz, Amigo Carlos. "Preparation of ring rearranged sesquiterpenes for use as agrochemical fungicides". Span. (2005), 10 pp. CODEN: SPXXAD ES 2241482 A1 20051016 CAN 144:192394.



Amina	Eq.	Temp.	Rto. (%) ^a	Aminoalcohol	Ref. ^d
Anilina (17a)	1	25 °C	92	18a	95
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	1	25 °C	68	18b	90a
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	2	25 °C	90	18b	90a
<i>p</i> -Nitroanilina (17c)	1	25 °C	70	18c	90a
<i>m</i> -Nitroanilina (17d)	2	25 °C	72	18d	89c
<i>o</i> -Nitroanilina (17e)	2	25 °C	56	18e	96
<i>p</i> -Bromoanilina (17f)	2	80 °C	53	18f	89a
<i>m</i> -Bromoanilina (17g)	2	25 °C	82	18g^c	-
<i>o</i> -Bromoanilina (17h)	2	80 °C	70	18h^c	97
<i>p</i> -Aminobenzoato de metilo (17i)	2	80 °C	80	18i^c	-
<i>o</i> -Aminobenzoato de metilo (17j)	2	25 °C	83	18j^c	-
5-Aminoisofthalato de dimetilo (17k)	2	25 °C	64	18k^c	-
4-Aminotereftalato de dimetilo (17l)	2	25 °C	78	18l	-
Fenil metil amina (17m)	2	25 °C	82	18m^c	90a
Bencil fenil amina (17n)	1	25 °C	62	18n^c	98
<i>n</i> -Butilamina (17o)	2	80 °C	n.r. ^b	-	90a
Diisopropilamina (17p)	2	80 °C	n.r. ^b	-	90a
<i>t</i> -Butilamina (17q)	2	80 °C	n.r. ^b	-	90a

a) Rendimiento obtenido tras purificación cromatográfica; b) no reacciona; c) preparado por primera vez mediante apertura de epóxidos; d) referencias que incluyen datos espectroscópicos para la identificación del compuesto.

Tabla IV.1. Síntesis de aminoalcoholes utilizando CH₃CN como disolvente.

⁹⁵ Barluenga, J.; Fañanás, F. J. and Yus, M. "β-Substituted organolithium compounds. New reagents for synthesis". *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4798-4801.

⁹⁶ Temal-Laieb, T.; Chastanet, J. and Zhu, J. "A Convergent Approach to Cyclopeptide Alkaloids: Total Synthesis of Sanjoinine G1". *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 583-590.

⁹⁷ Job, G. E. and Buchwald, S. L. "Copper-Catalyzed Arylation of β-Amino Alcohols". *Org. Letters* **2002**, *4*, 3703-3706.

⁹⁸ Chidichimo, G.; Cum, G.; Lelj, F.; Sindona, G. and Uccella, N. "Skeletal rearrangement of nitrogen, oxygen-heterocycles. The isoxazolinone to aziridine transformation induced by lithium aluminum hydride". *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1372-1377.

Cuando las reacciones se llevan a cabo en acetonitrilo seco, las aminas muestran un comportamiento paralelo al descrito en éter etílico.^{90c} Las aminas aromáticas reaccionan con el óxido de estireno en la posición bencílica sustituida. Esto permitió la preparación de algunos aminoalcoholes previamente descritos (**18a**, **18b**, **18c**, **18d**, **18e**, **18f**, **18h**) y de los compuestos **18g**, **18i**, **18j**, **18k** y **18l**, que no se encuentran descritos en la bibliografía.

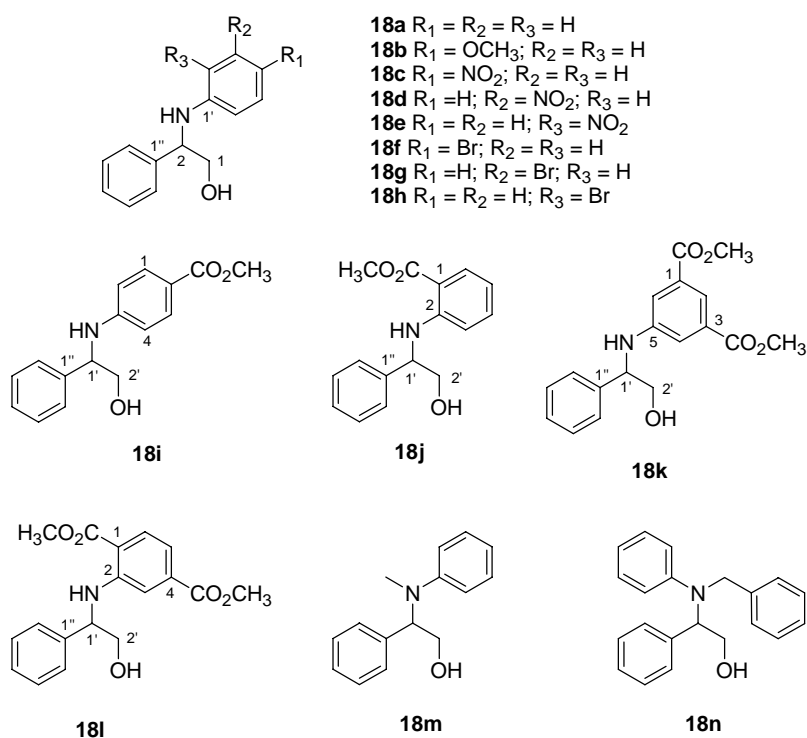


Figura IV.4. Aminoalcoholes preparados utilizando CH_3CN como disolvente.

La mayoría de las aminas alifáticas (*n*-butilamina, diisopropilamina, *tert*-butilamina) no reaccionan, pero, interesantemente, el tratamiento de bencilamina y óxido de estireno con $Sn(OTf)_2$ en acetonitrilo seco (figura IV.5), origina en una relación prácticamente equimolar, los dos posibles regioisómeros (**18r**^{90a} y **18r**^{90d}).

Las aminas secundarias, tipo alquil aril amina, parecen mostrar un comportamiento similar al de sus análogas aromáticas primarias, formando únicamente los productos

derivados del ataque en la posición bencílica, incluso en el caso de la bencil fenil amina (**17n**).

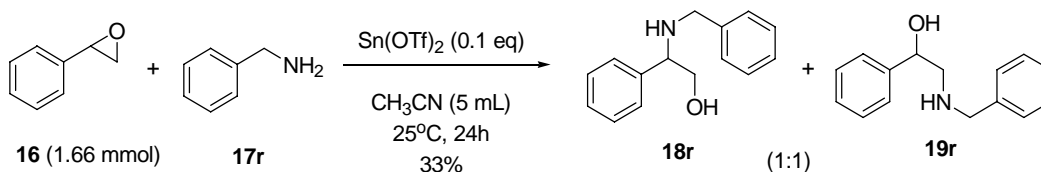
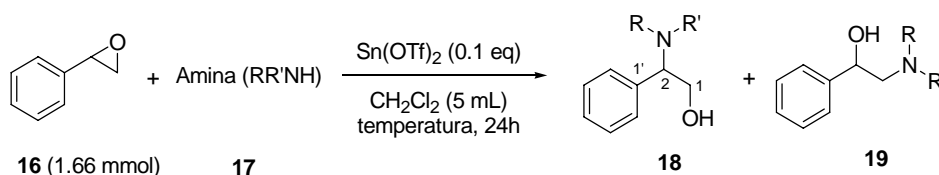


Figura IV.5. Reacción entre óxido de estireno y bencilamina (**17r**).

La falta de reactividad de las aminas alifáticas frente al óxido de estireno, cuando se emplea como catalizador Sn(OTf)_2 , parece superarse parcialmente cuando se utiliza diclorometano como disolvente.

Así, la reacción de *n*-butilamina y diisopropilamina con óxido de estireno, catalizada por Sn(OTf)_2 , origina el compuesto **18o** y una mezcla de **18p** y **19p**, respectivamente, cuando se utiliza diclorometano como disolvente.

Sin embargo, en el caso de *tert*-butilamina, la reacción con óxido de estireno, catalizada con Sn(OTf)_2 , falla incluso utilizando diclorometano como disolvente.



Amina	Eq.	Temp.	Rto. global (%) ^a	Relación 18:19	Ref. ^d
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	2	25 °C	68	18b:4b (100:0)	90a
Bencilamina (17r)	2	25 °C	78	18r:19r (51:49)	90a, d
Bencilamina (17r)	2	-30 °C	82	18r:19r (51:49)	90a, d
<i>n</i> -Butilamina (17o)	2	40 °C	62	18o:19o (100:0)	90a
<i>t</i> -Butilamina (17q)	2	40 °C	n.r. ^b	-	90a
Diisopropilamina (17p)	2	25 °C	n.r. ^b	-	90a
Diisopropilamina (17p)	2	40 °C	13 ^b	18p^d:19p (44:56)	90a

a) Rendimiento obtenido tras purificación cromatográfica; b) no reacciona; c) referencias que incluyen datos espectroscópicos para la identificación del compuesto; d) no se han encontrado datos espectroscópicos en la bibliografía para este compuesto.

Tabla IV.2. Síntesis de aminoalcoholes utilizando CH_2Cl_2 como disolvente.

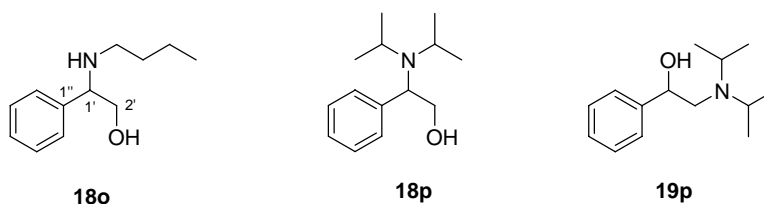


Figura IV.6. Aminoalcoholes preparados utilizando CH_2Cl_2 como disolvente.

El comportamiento descrito anteriormente, cuando se emplea acetonitrilo como disolvente, puede ser explicado mediante un mecanismo en el que la activación del epóxido por el catión metálico no es impedida por una interacción fuerte entre éste y las aminas aromáticas. Éste no es el caso de las aminas alifáticas, donde probablemente el ion metálico se encuentra fuertemente coordinado por las aminas alquílicas, más nucleofílicas.

Por otro lado, en diclorometano, la coordinación entre el ion metálico y las aminas alquílicas es menos estrecha, permitiendo la activación del óxido de estireno cuando la amina utilizada no está muy impedida.

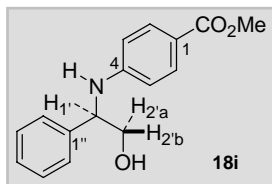
De todos modos, se necesita de un estudio adicional de disolventes y reactivos para confirmar esta hipótesis y poder explicar el comportamiento de aminas como bencilamina, que es capaz de reaccionar cuando se emplean como disolvente tanto diclorometano como acetonitrilo.

Las estructuras de todos los compuestos sintetizados fueron caracterizadas mediante el análisis de los datos obtenidos a partir de sus espectros de masas, IR y resonancia magnética nuclear.

Así, todos mostraron en sus espectros de IR las bandas anchas características de los alcoholes y aminas a 3300 cm^{-1} ($\nu\text{ O-H}$) y 2900 cm^{-1} ($\nu\text{ C-H}$, N-CH).

En el análisis estructural de estos compuestos, la única dificultad radica en determinar en qué posición se ha dado el ataque, es decir, si la apertura se ha dado sobre el carbono más o menos sustituido. Esta información se obtiene, fundamentalmente, de los experimentos de RMN, en particular, del experimento de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C a larga distancia, gHMBC.

A continuación, a modo de ejemplo, discutiremos la asignación espectroscópica del compuesto 4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18i**), no descrito en la bibliografía hasta el momento.

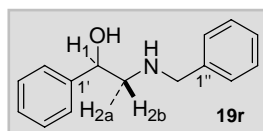


En el espectro de RMN de ^1H , aparecen tres señales doblete de doblete a δ 3.91, 3.99 y 4.56 ppm, características de protones sobre carbonos unidos a heteroátomos; según el experimento de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C gHSQC, sabemos que las dos primeras corresponden al sistema CH_2 (H-2'a y H-2'b), y su carbono aparece en el espectro de RMN de ^{13}C como triplete a δ 67.1 ppm (C-2'), mientras que la última es un CH (H-1'), con el carbono a δ 59.2 ppm (C-1').

En el espectro de RMN de ^{13}C aparecen dos señales de carbonos cuaternarios a δ 139.3 y 151.1 ppm, correspondientes a C-1'' y C-4, respectivamente. El estudio del acoplamiento a larga distancia de estas dos señales con los diferentes protones nos permite deducir la estructura del compuesto. Así, en este caso, el carbono C-1'' se correlaciona tanto con el sistema CH_2 como con el CH, mientras que C-4 sólo lo hace con este último, por lo que se concluye que ataque de la amina se ha producido sobre la posición más sustituida del epóxido.

La asignación anterior se ve reforzada por los datos observados en el espectro de masas, donde aparece una señal correspondiente a una pérdida de 31 unidades, lo que corrobora la existencia del sistema CH_2OH en la molécula.

Para el caso contrario al descrito anteriormente, es decir, un compuesto producto de la apertura del epóxido en la posición menos sustituida, analizaremos la asignación de los datos espectroscópicos para el aminoalcohol 2-bencilamino-2-feniletanol (**19r**).



En el espectro de RMN de ^1H de este compuesto aparecen 4 señales doblete de doblete correspondientes a protones sobre carbonos unidos a heteroátomos, a δ 2.78, 2.96, 3.87 y 4.78 ppm. Según el experimento de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C gHSQC, sabemos que las dos primeras corresponden al sistema CH_2 (H-2a y H-2b), y su carbono aparece en el espectro de RMN de ^{13}C como triplete a δ 56.5 ppm (C-2), la que aparece a 3.87 ppm pertenece al sistema $\text{CH}_2\text{-Ph}$, y su carbono presenta un desplazamiento químico de 53.5 ppm, mientras que la última es un CH (H-1'), con el carbono a δ 59.2 ppm (C-1).

El estudio del acoplamiento a larga distancia de las señales del carbono bencílico ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) con los diferentes protones nos permite deducir la estructura del compuesto. Así, este carbono se correlaciona con el sistema CH_2 , por lo que se propone la estructura correspondiente a un ataque de la amina sobre la posición menos sustituida del epóxido, ya que en el caso opuesto, debería aparecer correlación con el sistema CH.

V. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGIESTÁTICA.

En el presente apartado, se evaluará y discutirá la actividad fungiestática de los compuestos cuya preparación se ha detallado en capítulos anteriores.

El test de actividad fungiestática al que se somete a los productos es el de crecimiento del micelio. En la modalidad que llevamos a cabo se emplea un medio sólido al que, tras ser esterilizado y enfriado a una temperatura de 45-50 °C, se le añade el producto objeto del bioensayo, en la cantidad necesaria para conseguir la concentración adecuada. El producto se añade disuelto en una cantidad de disolvente (etanol, DMSO, etc.)^{99,100} que no supere, en ningún caso, el 1% del total del medio.

Seguidamente, se vierte el medio con el producto en una placa Petri en condiciones asépticas y, transcurrido el tiempo necesario para su solidificación, se inocula centralmente un disco^{101,102} de 5 mm de diámetro, obtenido de un cultivo del hongo que había estado creciendo durante 24 horas. Los ensayos se realizan por duplicado, con tres réplicas por cada concentración y se toma como control una preparación cuyo medio sólo contiene la misma cantidad de disolvente que se ha añadido para disolver el producto.

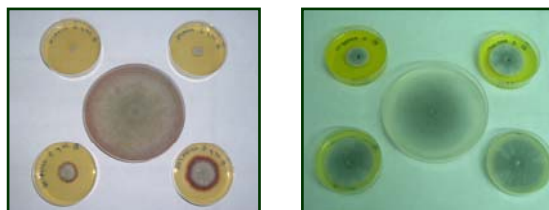


Figura V.1. Bioensayo de actividad fungiestática sobre *B. cinerea* 2100 y *C. gloeosporioides* 20122.

⁹⁹ Leroux, P. and Gredt, M.C.R. "Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*". *Pestic. Sci.* **1984**, 15, 85-89.

¹⁰⁰ Rewal, N.; Coley-Smith, J.R. and Sealy-Lewis, H.M. "Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*". *Plant. Pathol.* **1991**, 40, 554-560.

¹⁰¹ Smith, T.A.; Barker, J.H.A. and Jung, M. "Growth inhibition of *Botrytis cinerea* by compounds interfering with polyamine metabolism". *J. Gen. Microbiol.* **1990**, 136, 985-992.

¹⁰² Fallik, E. and Grinberg, S. "Hinokitiol: a natural substance that controls postharvest diseases in eggplant and pepper fruits". *Postharvest Biol. Technol.* **1992**, 2, 137-144.

Las placas se cultivan en condiciones de crecimiento óptimo durante un período de 7 días, registrándose diariamente el diámetro promedio de crecimiento miceliar. En la *figura V.1* se muestra un ejemplo del aspecto que presentan las placas en este ensayo.

Con los datos recopilados de los bioensayos se obtuvieron los valores de porcentaje de inhibición del crecimiento (I%)¹⁰³ y la concentración efectiva para reducir el crecimiento de la colonia un 50% (EC₅₀)^{99,104} que emplearemos para comparar la posible eficacia como agentes fungicidas de los compuestos evaluados.

V.1. Ensayos de actividad fungiestática sobre *Botrytis cinerea* 2100.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad fungiestática sobre *Botrytis cinerea* de los compuestos que se muestran en la *figura V.2*: 2-(fenilamina)-2-feniletanol (**18a**), 2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (**18b**), 2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18c**), 2-(3'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18d**), 2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18e**), 2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18f**), 2-(3'-bromofenilamino)-2-fenil-etanol (**18g**), 2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18h**), 4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18i**), 2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18j**), 3-carboximetil-5-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18k**), 4-carboximetil-2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)-benzoato de metilo (**18l**), 2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (**18m**), 2-(bencilfenilamino)-2-feniletanol (**18n**), 2-butilamino-2-feniletanol (**18o**), 2-diisopropilamino-2-feniletanol (**18p**), 2-diisopropilamino-1-feniletanol (**19p**), 2-bencilamino-2-feniletanol (**18r**) y 2-bencilamino-1-feniletanol (**19r**).

¹⁰³ Amer, M. A. and Poppe, J. "In vitro evaluation of adjuvants for more rational fungicide treatments". *Med. Fac. Landbouwwet* **1991**, 56 (2b), 545-558.

¹⁰⁴ Heaton, P. E.; Callow, M. E. and Butler, G. M. "Control of mold growth by anti-fungal paints". *International Biodeterioration* **1991**, 27, 163-173.

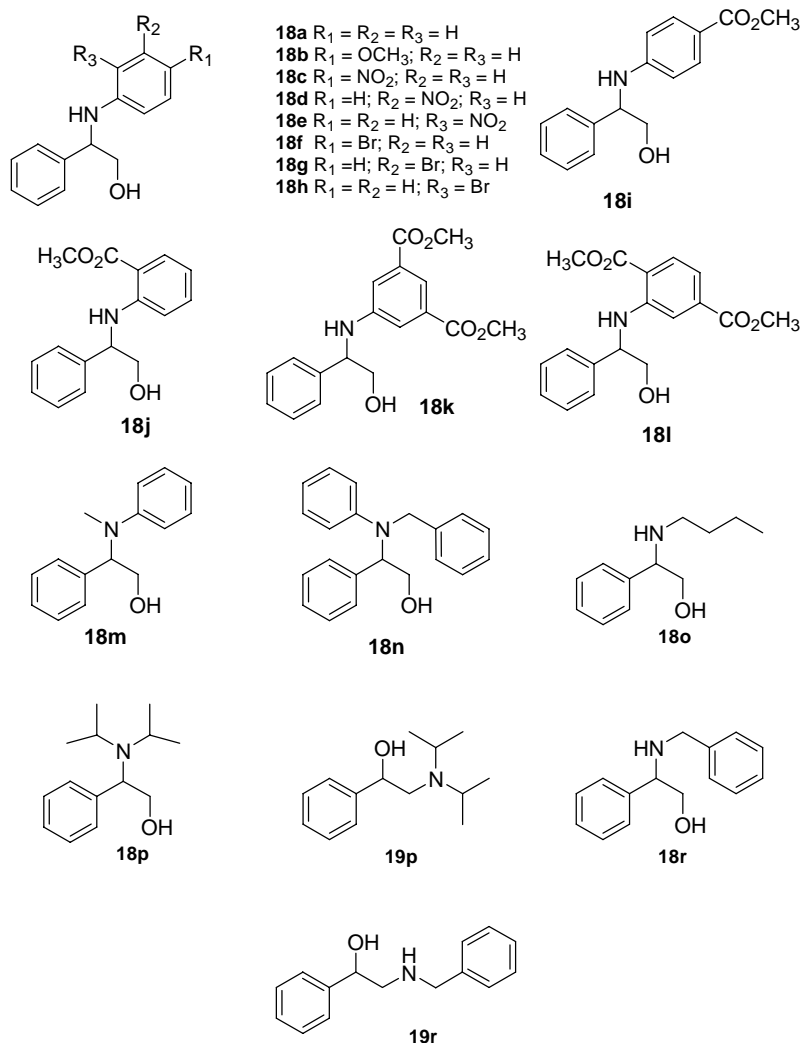


Figura V.2. Estructuras de los compuestos ensayados.

Los productos ensayados presentan diversa funcionalización, principalmente en los anillos aromáticos de la parte nitrogenada de la molécula.

Dado el número de compuestos preparados, y para poder realizar una comparación más directa de la actividad fungiestática de los mismos, se presenta una tabla resumen de los datos de EC_{50} de los compuestos evaluados, calculados como medias de los dos bioensayos de tres réplicas realizados.

Botrytis cinerea 2100										
EC ₅₀	18a	18b	18c	18d	18e	18f	18g	18h	18i	
72 h	70±6	138±4	78±7	40±6	54±11	7±2	3±2	6±4	79±7	
120 h	35±3	-	29±7	18±4	32±5	11±4	4±1	11±9	54±10	
EC ₅₀	18j	18k	18l	18m	18n	18o	18p	19p	18r	19r
72 h	26±4	105±9	51±11	52±6	45±48	-	172±26	360±88	-	240±35
120 h	31±5	68±9	106±25	38±4	26±8	-	-	-	-	-

Tabla V.1. Resumen de los valores de EC₅₀ frente a *Botrytis cinerea*.

Aquellos valores que no aparecen se deben a la falta de actividad de los compuestos en cuestión.

Atendiendo a los valores de EC₅₀ a 72 y 120 horas (3 y 5 días, respectivamente), pueden clasificarse los aminoalcoholes evaluados frente a *B. cinerea* en 3 grupos:

- Aquéllos con nula o escasa actividad, que presentan valores de EC₅₀ superiores a 100 ppm.
- Aquéllos con actividad moderada, con valores de EC₅₀ comprendidos entre 40 y 100 ppm.
- Aquéllos con una actividad elevada, con valores de EC₅₀ menores de 40 ppm.

<i>Botrytis cinerea</i>	Alta actividad (EC ₅₀ < 40 ppm)	Actividad moderada (40 < EC ₅₀ < 100 ppm)	Escasa o nula actividad (EC ₅₀ > 100 ppm)
72 h.	18d, 18f, 18g, 18h, 18j	18a, 18c, 18e, 18i, 18l, 18m, 18n	18b, 18k, 18o, 18p, 19p, 18r, 19r
120 h.	18a, 18c, 18d, 18e, 18f, 18g, 18h, 18j, 18m, 18n	18i, 18k	18b, 18l, 18o, 18p, 19p, 18r, 19r

Dentro del primer grupo de compuestos, tanto a 3 como a 5 días, están aquellos aminoalcoholes preparados a partir de aminas alifáticas (**18o**, **18p**, **19p**, **18r**, **19r**) y el preparado a partir de *p*-metoxianilina (**18b**).

El resto de los compuestos preparados, salvo **18k** para 72 horas, y **18l** para 120 horas, presentan actividad alta o moderada, y todos tienen como factor común la presencia de un anillo aromático unido directamente al átomo de nitrógeno sustituido con grupos aceptores de electrones.

De este grupo de compuestos, destacan en actividad los compuestos **18f**, **18g** y **18h**, mostrando los valores más bajos de EC_{50} , tanto a 72 como a 120 horas; todos ellos presentan un átomo de bromo en uno de los anillos aromáticos. El compuesto de mayor actividad es el compuesto **18g**, que dispone su átomo de bromo con sustitución *meta*. En la *figura V.3* se muestran los resultados del ensayo de inhibición de *B. cinerea* por el compuesto **18g**.

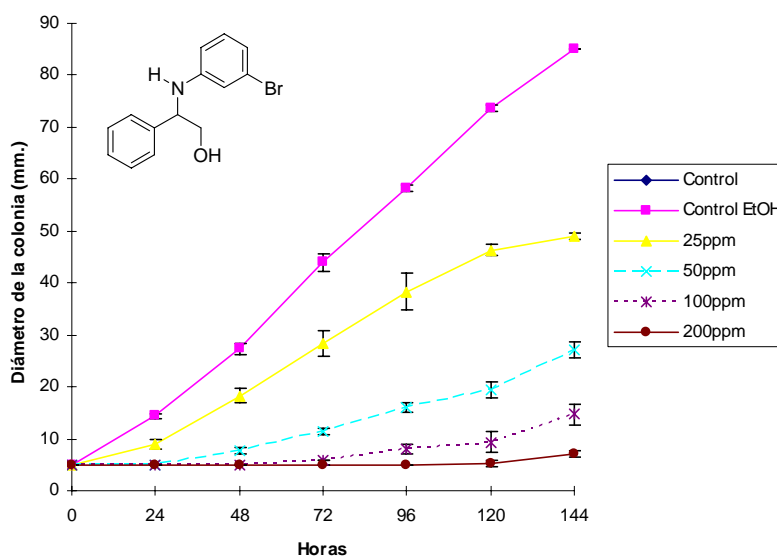


Figura V.3. Ensayo de inhibición de *B. cinerea* por el compuesto **18g**.

Dentro del grupo de compuestos de alta actividad hemos incluido también a los compuestos **18d** y **18j**, que presentan, respectivamente, un grupo NO_2 en posición *meta* y un grupo metoxycarboxilato en posición *orto* sobre un anillo aromático. En el primer caso, la actividad del compuesto **18d** es la máxima dentro de la serie de los compuestos mononitrados sustituidos en *para* (**18c**), *meta* (**18d**) y *orto* (**18e**), tanto a 3 como a 5 días.

Dentro de la serie de todos los compuestos con uno o más sustituyentes metoxycarbonil, el compuesto **18j** es el más activo, tanto a 3 como a 5 días. Esta actividad disminuye considerablemente al aumentar el número de grupos metoxycarbonil, a pesar de estar presente uno de estos grupos en *orto* sobre el anillo aromático (compuesto **18i**).

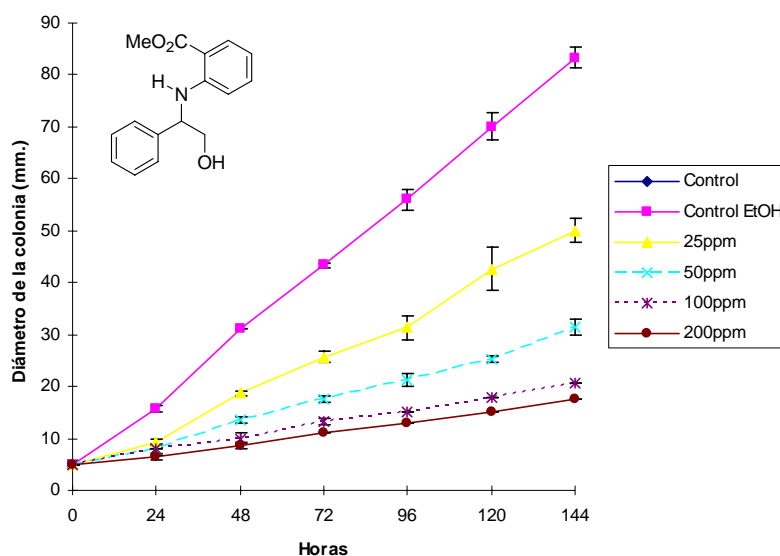


Figura V.4. Ensayo de inhibición de *B. cinerea* por el compuesto **18j**.

Cuando se trata de los aminoalcoholes derivados de anilina, *N*-metilanilina y *N*-bencilamina, compuestos **18a**, **18m** y **18n**, la actividad general es moderada a los 3 días de bioensayo, presentado valores de EC_{50} ligeramente superiores a 40 ppm, mientras que se comportan como buenos agentes fungiestáticos a los 5 días, con EC_{50} inferiores a 40 ppm, como se observa en la *tabla V.1*. Así parece que los compuestos derivados de aminas disustituidas, **18m** y **18n**, presentan un pequeño aumento de actividad con respecto al compuesto derivado de anilina, **18a**.

V.2. Ensayos de actividad fungistática sobre *Colletotrichum gloeosporioides* 20122.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad fungistática frente a *C. gloeosporioides* con los compuestos representados en la figura V.5.

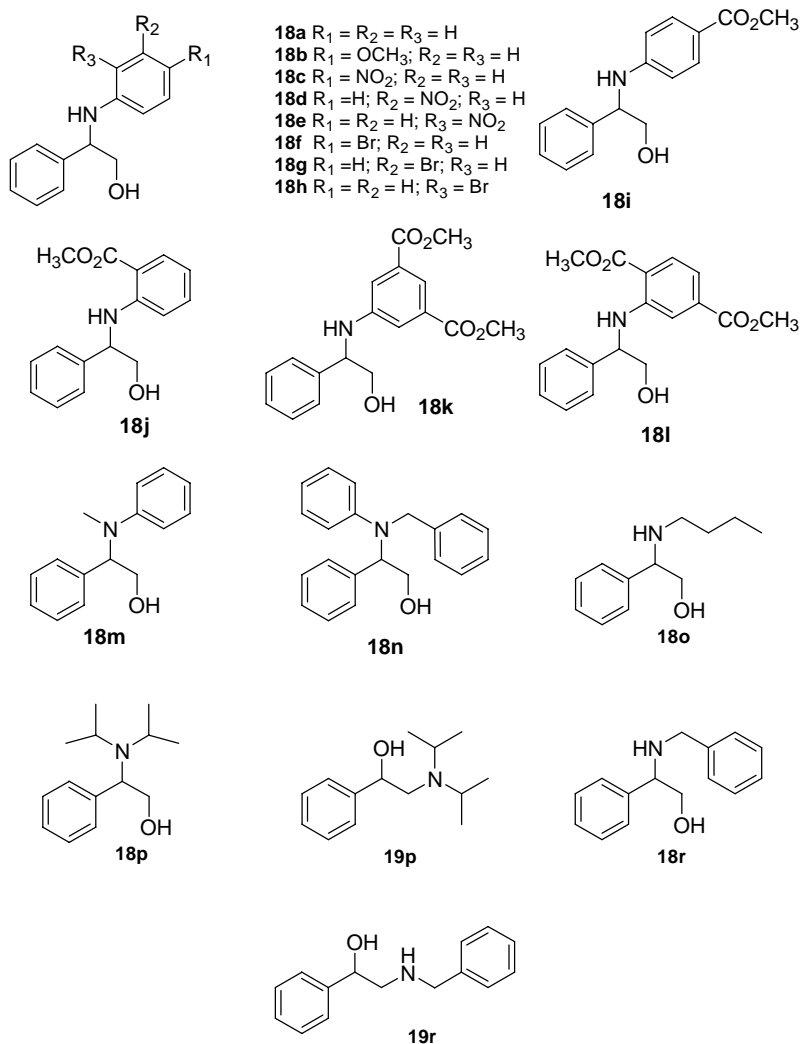


Figura V.5. Estructuras de los compuestos ensayados.

Dado el número de compuestos preparados y para poder comparar la actividad fungistática de los mismos, se presenta una tabla resumen de los datos de EC_{50} de los

compuestos evaluados, calculados como medias de los dos bioensayos de tres réplicas realizados.

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122									
EC ₅₀	18a	18b	18c	18d	18e	18f	18g	18h	18i
72 h	-	220±28	81±15	46±5	49±4	8±3	14±5	23±5	68±4
120 h	-	175±23	84±6	45±5	46±6	13±4	16±4	26±6	76±9
EC ₅₀	18j	18k	18l	18m	18n	18o	18p	19p	18r
72 h	41±8	64±7	288±95	98±33	4±3	-	-	-	-
120 h	41±8	65±10	432±152	52±18	6±5	-	-	-	-

Tabla V.2. Resumen de los valores de EC₅₀ frente a *Colletotrichum gloeosporioides*.

Aquellos valores que no aparecen se deben a la falta de actividad de los compuestos en cuestión.

Atendiendo a los valores de EC₅₀ a 72 y 120 horas (3 y 5 días, respectivamente), pueden clasificarse los aminoalcoholes evaluados frente a *C. gloeosporioides* en 3 grupos:

- Aquéllos con nula o escasa actividad, que presentan valores de EC₅₀ superiores a 100 ppm.
- Aquéllos con actividad moderada, con valores de EC₅₀ comprendidos entre 40 y 100 ppm.
- Aquéllos con una actividad elevada, con valores de EC₅₀ menores de 40 ppm.

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Alta actividad (EC ₅₀ < 40 ppm)	Actividad moderada (40 < EC ₅₀ < 100 ppm)	Escasa o nula actividad (EC ₅₀ > 100 ppm)
72 h.	18f, 18g, 18h, 18n	18c, 18d, 18e, 18i, 18j, 18k, 18m	18a, 18b, 18l, 18o, 18p, 19p, 18r, 19r
120 h.	18f, 18g, 18h, 18n	18c, 18d, 18e, 18i, 18j, 18k, 18m	18a, 18b, 18l, 18o, 18p, 19p, 18r, 19r

Dentro del primer grupo, tanto a 3 como a 5 días, no sólo están aquellos aminoalcoholes preparados a partir de aminas alifáticas (**18o**, **18p**, **19p**, **18r**, **19r**), sino también los preparados a partir de anilina (**18a**), *p*-metoxianilina (**18b**) y 4-aminotereftalato de dimetilo (**18l**).

El resto de los compuestos preparados presentan actividades de altas a moderadas, aunque no todos los comportamientos son paralelos a los observados con *B. cinerea*. De forma análoga a lo que sucedía frente a *B. cinerea*, los compuestos activos presentan esencialmente un anillo aromático con un sustituyente atractor de electrones. Dentro de todos estos compuestos destacaremos algunos grupos.

Los compuestos más activos frente a *C. gloeosporioides* son, nuevamente, aquéllos que presentan un átomo de bromo (**18f**, **18g** y **18h**), aunque, en este caso, el compuesto más activo de los tres es el que presenta el átomo de bromo con sustitución *para*. En la figura V.6 se muestran los resultados del ensayo de inhibición de *C. gloeosporioides* por el compuesto **18f**.

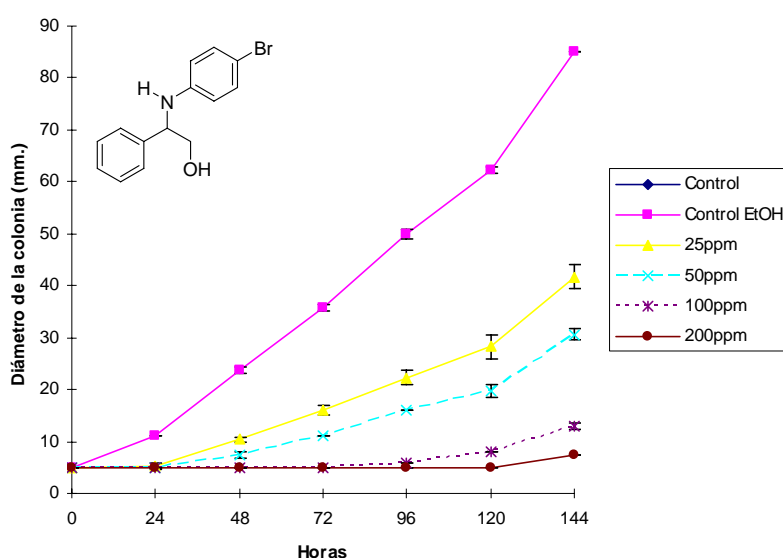


Figura V.6. Ensayo de inhibición de *C. gloeosporioides* por el compuesto **18f**.

Nuevamente los compuestos derivados de ésteres de ácido benzoico, presentan una actividad destacada. Así, el aminoalcohol **18j**, que presenta el grupo éster en posición *orto*, se encuentra entre los compuestos más activos evaluados, presentando un EC_{50} de 41 ppm para los 3 y 5 días de bioensayo. Cuando la sustitución del anillo se presenta en posición *para*, compuesto **18i**, el valor de EC_{50} aumenta un poco, aunque el compuesto sigue siendo activo. Los compuestos diesterificados presentan resultados bastante diferentes; así el compuesto **18k**, derivado de aminoisofalato de dimetilo, se comporta

como un buen agente fungiestático, tanto a los 3 como a los 5 días de bioensayo, mientras que en el caso del compuesto **18l**, derivado de aminotereftalato de dimetilo, se observa una pérdida total de la actividad.

Dado que estos compuestos no habían sido preparados con anterioridad y debido al interesante patrón de actividad mostrado, se ha solicitado una patente sobre derivados con esqueleto de fenilhidroxietilamino benzoico y su preparación, para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos, como agentes fungiestáticos.¹⁰⁵

Cuando se trata de los aminoalcoholes derivados de anilinas, compuestos **18a**, **18m** y **18n**, el comportamiento abarca desde la inactividad fungiestática de **18a**, hasta el excelente y mejor comportamiento de los compuestos evaluados del compuesto **18n**, derivado de bencil anilina, como se observa en la *tabla V.1*.

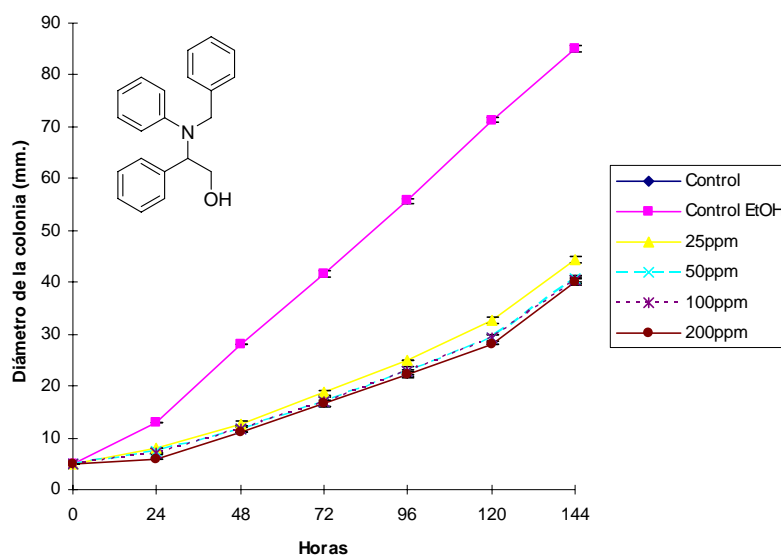


Figura V.7. Ensayo de inhibición de *C. gloeosporioides* por el compuesto **18n**.

¹⁰⁵ Femenía Ríos, M^a Encarnación; González Collado, Isidro and Macías Sánchez, Antonio José. "Derivados con esqueleto de (fenilhidroxietilamino)benzoico y un procedimiento para su preparación, como agentes fungiestáticos". Patente española, n^o solicitud: P200700593.

VI. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES.

El término “especies activas de oxígeno” (ROS, del inglés: “reactive oxygen species”) describe de manera colectiva a especies radicalarias de oxígeno como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y a especies no radicalarias de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso. El aumento de su producción parece estar asociado a diferentes formas de daño en tejidos,¹⁰⁶ aunque es materia de discusión si son causa primaria del daño, o son consecuencias del mismo.^{106b,106c,107} Sea cual sea el caso, la formación de radicales libres está implicada en multitud de cuadros de enfermedades, desde aquellas que implican daño inflamatorio o inmunitario, al infarto de miocardio y el cáncer. Algunos de los efectos de una excesiva generación de especies activas de oxígeno en sistemas biológicos incluye la peroxidación de membranas de lípidos, el daño oxidativo sobre ácidos nucleicos y carbohidratos y la oxidación de grupos funcionales que contengan azufre en proteínas.^{106b,106c,107,108} Los radicales libres derivados del oxígeno parecen tener la propensión de iniciar y promover la carcinogénesis, además de cumplir un destacado papel en enfermedades como la arteriosclerosis, el infarto de miocardio, la artritis y la isquemia.^{106c, 106a}

Ante este panorama, queda clara la importancia de los mecanismos de defensa contra el daño oxidativo en los organismos vivos. La detoxificación de las ROS en las células se lleva a cabo mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, las glutatión peroxidasas, la D-T diaforasa y los sistemas enzimáticos regeneradores del glutatión.^{108,106a} Algunos de estos sistemas enzimáticos como la SOD o la catalasa

¹⁰⁶ a) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview”. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 1-85; b) Halliwell, B. “Drug antioxidant effects”. *Drugs* **1991**, 42, 569-605; c) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. “Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?” *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, 119, 598-620.

¹⁰⁷ Halliwell, B. “Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease”. *Am. J. Med.* **1991**, 91, 14S-22S.

¹⁰⁸ a) Sies, H. “Oxidative Stress”, Academic Press, London, **1985**; b) Sies, H. “Oxidative Stress: From basic research to clinical application”. *Am. J. Med.* **1991**, 91, 31S-38S.

actúan específicamente sobre las ROS. Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos o compuestos antioxidantes son menos específicos y pueden capturar otros radicales, tanto orgánicos como inorgánicos. Estos compuestos antioxidantes pueden clasificarse como solubles en agua o en lípidos, dependiendo de si actúan primariamente en la fase acuosa o en la región lipofílica de las membranas celulares. Entre los antioxidantes hidrofílicos podemos incluir al ácido ascórbico o al urato, mientras que compuestos como los ubiquinoles, retinoides, carotenoides y tocoferoles (vitamina E) se pueden englobar entre los antioxidantes lipofílicos.¹⁰⁹ Las proteínas plasmáticas, GSH, urato y otros compuestos son antioxidantes endógenos, mientras que compuestos como el ácido ascórbico, los carotenoides, retinoides, flavonoides¹¹⁰ y tocoferoles llegan al cuerpo humano a través de la dieta. Estos compuestos pueden atrapar y destruir diversos tipos de radicales (sobre oxígeno o carbono, radicales alcoxi, peroxi o fenoxi) y especies reactivas de oxígeno. Algunos de estos compuestos no son reciclables, mientras que otros si lo son, tanto por el concurso de sistemas enzimáticos o de otros compuestos antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones oxidativas en cadena. Los antioxidantes naturales constituyen un amplio grupo de compuestos que incluye principalmente compuestos polifenólicos y vitaminas.¹¹¹

Hoy día numerosas enfermedades se asocian con la formación de oxígeno reactivo y la inducción de peroxidación lipídica. Las especies de oxígeno reactivo están implicadas en los procesos de daño celular y son relevantes en procesos de inflamación y

¹⁰⁹ Sies, H. and Krinsky, N. I. "The present status of antioxidant vitamins and β -carotene". *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 62, 1229S-1300S.

¹¹⁰ a) Kandaswami, C. and Middleton, E. "Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids", in *Free Radicals in Diagnostic Medicine* (Armstrong D ed) **1994**, pp 351–376, Plenum Press, New York; b) Kandaswami, C. and Middleton, E. "Flavonoids as antioxidants", in *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications* (Shahidi F ed) **1995**, pp 174– 203, AOCS Press, Champaign, IL.

¹¹¹ Velioglu, Y. S.; Maua, G.; Gao, Y. L. and Oomah, B. D. "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products". *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4113-4117.

envejecimiento, en trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos, etc.¹¹² Esto ha conducido a una intensa investigación del uso de los antioxidantes presentes en los alimentos, así como de los procedentes de otras fuentes, para la prevención de este tipo de enfermedades.

Por otra parte, el interés de los antioxidantes no solo reside en su utilidad como fármacos, sino también en su uso como aditivos industriales. Fundamentalmente se utilizan como conservantes de alimentos, plásticos, caucho, cosméticos y aceites y grasas industriales.

Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres se emplea, entre otros, un bioensayo *in vitro* que se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH[•]), de color violeta intenso, al ser capturado pierde su color característico. Así, es posible cuantificar la capacidad atrapadora de radicales libres que poseen distintas sustancias, mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH[•], tanto en disolución como en cromatografía en capa fina.

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo un ensayo cuantitativo de la actividad antioxidante del producto natural (-)-gloeosporiol ((-)-I), siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams *et al* (*Parte Experimental, apartados I.6 y VIII*),¹¹³ cuyos resultados se resumen a continuación.

EC ₅₀	ARP	Valor estequiométrico	Nº de moles de DPPH [•] reducido
0.14	7.02	0.28	3.51

La evolución de las distintas cinéticas de reacción depende de la naturaleza del antioxidante evaluado. Así, se presentan tres tipos de comportamiento:¹¹³

- Cinética rápida: el estado estacionario se alcanza en menos de 1 minuto, como es el caso de ácido ascórbico (E-300), ácido isoascórbico e isoeugenol.

¹¹² Ramarathnam, N.; Ochi, H.; Takeuchi, M. "Antioxidant defense in vegetable extracts". En: *Natural antioxidants chemistry, health effects and applications*, Shahidi F (Ed) **1996**, pp 76-78.

¹¹³ Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25–30.

- Cinética intermedia: el estado estacionario tarda en alcanzarse, aproximadamente, entre 5 y 30 minutos; como, por ejemplo, para los compuestos ácido rosmarínico y δ -tocoferol (E-309).
- Cinética lenta: el estado estacionario se alcanza cuando han transcurrido más de 30 minutos de reacción; entre otros compuestos que presentan este tipo de comportamiento, se encuentran ácido *p*-cumárico, BHT (E-321), BHA (E-320), ácido protocatéquico y ácido cafeico.

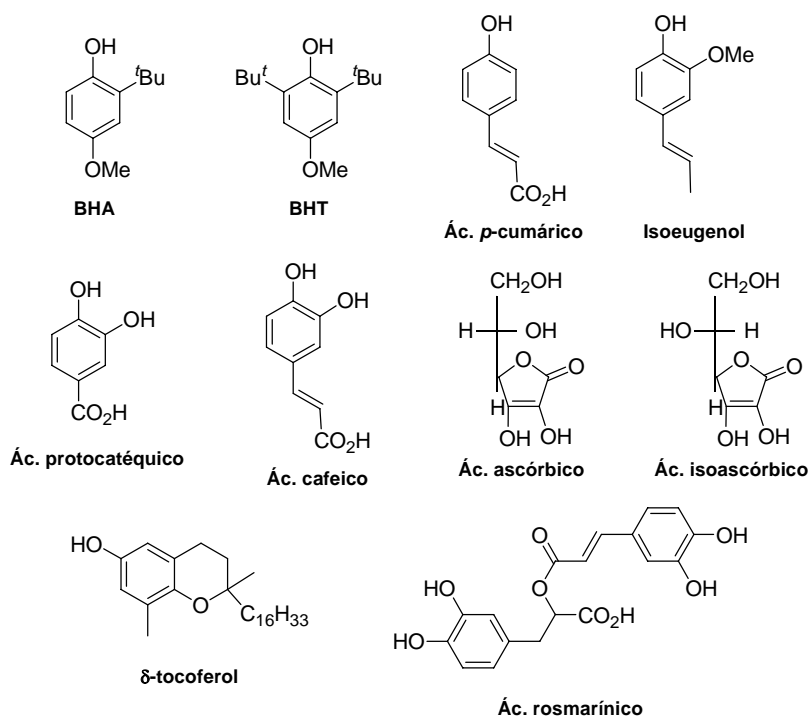


Figura VI.1. Ejemplos de antioxidantes con distintos comportamientos cinéticos.

Teniendo en cuenta la clasificación anterior, queda claro que el antioxidante objeto de nuestro estudio, (-)-gloeosporiol, presenta un comportamiento cinético lento, ya que en su reacción con el radical DPPH alcanza el estado estacionario a los 120 minutos.

Como se indica en la parte experimental (*Parte Experimental, apartado 1.6*), la actividad antirradicalaria se evalúa a partir de la representación gráfica del porcentaje de radical DPPH remanente cuando se ha alcanzado el estado estacionario, en función de

la relación molar entre el antioxidante y el DPPH[•], en contraste con otros investigadores,¹¹⁴ que determinan el EC₅₀ a los 30 minutos de reacción. Para aquellos compuestos que reaccionan rápidamente con el radical DPPH, no se aprecian diferencias en los valores de ARP calculados tanto a los 30 minutos como en el estado estacionario, sin embargo, en el caso de comportamientos cinéticos lentos, un ARP determinado a los 30 minutos sería erróneo, ya que la reacción sigue progresando (por ejemplo, en el caso del antioxidante comercial BHT, ARP_{30 min.} = 1.06 y ARP_{120 min.} = 5.30).

Por tanto, la clasificación de la actividad antirradicalaria se realiza en función de los valores de ARP, tal y como se muestra en la *tabla VI.1*.

El valor de la estequiometría de la reacción se obtiene multiplicando el valor del EC₅₀ de cada antioxidante por dos (2xEC₅₀), lo que proporciona información sobre la concentración efectiva teórica de cada antioxidante necesaria para reducir un 100% la concentración de DPPH[•].

En la *tabla VI.1*, estos datos se presentan acompañados de sus valores inversos, que nos permite conocer el número de moles reducidos de DPPH[•] por cada mol de antioxidante.

¹¹⁴ a) Lamaison, J. L.; Petitjean-Freytet, C.; Carnat, A. P. and Carnat, A. "Activités antiradicalaires *in vitro* d'huiles essentielles". *Plantes Médicinales et Phytothérapie* **1988**, 22, 231-234; b) Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K. and Nakamura, T. "Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion". *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 945-948; c) Juménez, J.; Navarro, M. C.; Montilla, M. P. and Martín, A. "Thymus zygis oil: its effects on CCl₄-induced hepatotoxicity and free radical scavenger activity". *J. Essential Oil Res.* **1993**, 5, 153-158.

Comportamiento cinético	Compuesto	ARP	Valor estequiométrico	Nº de DPPH [•] reducido
Rápido	Isoeugenol	1.94	1.03	0.97
	Ác. Ascórbico	3.70	0.54	1.85
	Ác. Isoascórbico	3.70	0.54	1.85
Intermedio	δ-tocoferol	4	0.50	2
	Ác. Rosmarínico	6.90	0.30	3.33
Lento	Ác. <i>p</i> -cumárico	0.02	98	<1
	BHA	4.17	0.38	2.63
	BHT	4.20	0.38	2.63
	Ác. Protocatéquico	7.14	0.28	3.6
	Ác. cafeico	9.1	0.22	4.54
	(-)-gloeosporiol	7.02	0.28	3.51

Tabla VI.1. Clasificación del poder antirradicalario y la estequiometría de la reacción, de acuerdo con el comportamiento cinético.

El compuesto objeto de nuestro estudio, (-)-gloeosporiol, presenta una actividad antirradicalaria comparable con la de BHT, ácido cafeico o ácido protocatéquico, como se observa en la *tabla VI.1*. Todos estos compuestos presentan un comportamiento cinético lento en su reacción con el radical DPPH.¹¹³

La actividad antirradicalaria de (-)-gloeosporiol puede racionalizarse a través de un mecanismo que constaría de los siguientes pasos:

1. Reacción inicial de DPPH[•] con un protón fenólico.
2. Donación de un segundo hidrógeno, seguida de deslocalización electrónica, hacia la posición *para* del anillo aromático (reacción [1] de la *figura VI.2*).
3. Dimerización entre los dos radicales aromáticos generados. Tras esta dimerización, se regenerarían dos grupos hidroxilo, mediante una transferencia intramolecular de H[•], de modo que podría reaccionar de nuevo con el radical DPPH (reacción [2] de la *figura VI.2*).
4. Complejación entre una molécula de DPPH[•] y el radical ariloxilo generado (reacción [3] de la *figura VI.2*).

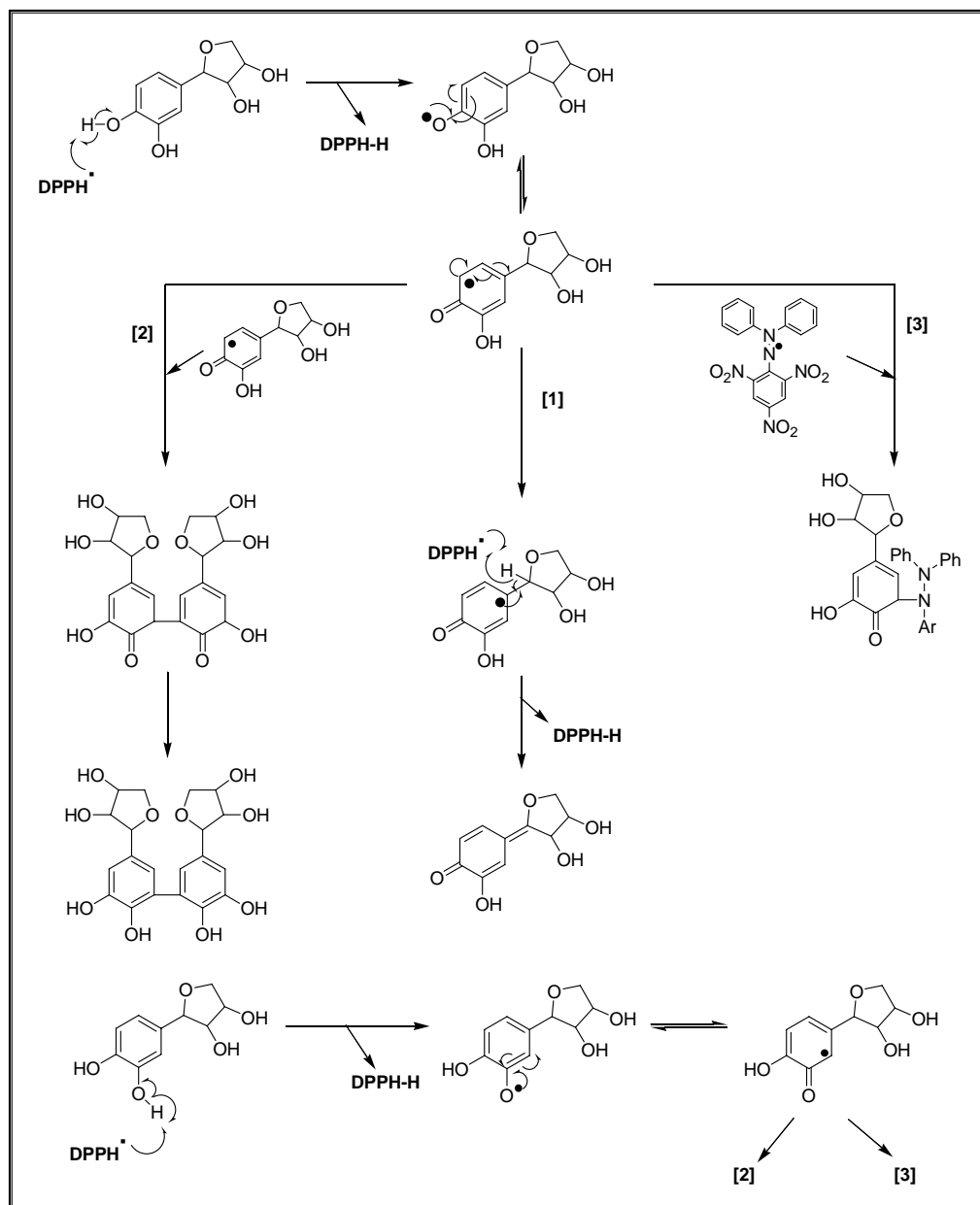


Figura VI.2. Posibles reacciones entre el radical DPPH y (-)-gloeosporiol.

Parte experimental

I. MATERIALES Y MÉTODOS.

I.1. Técnicas instrumentales.

Puntos de fusión:

Se midieron en un aparato Reichert-Jung.

Espectroscopía Ultravioleta:

Los espectros se registraron en un espectrofotómetro UV-Visible Varian, modelo Cary 50. Las muestras se disolvieron en metanol Aldrich 99.9% A.C.S. grado espectrofotométrico.

Actividades ópticas ($[\alpha]_D$):

Se midieron con un polarímetro Perkin Elmer 341, provisto de lámpara de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$), con celda estándar de 1 dm de longitud y 1 mL de volumen. Se utilizaron cloroformo y metanol como disolventes (Aldrich 99.9% A.C.S. grado espectrofotométrico). Para calcular la rotación específica, $[\alpha]$, se aplicó su definición:

$$[\alpha]_t^{t^{\circ}C} = \frac{\alpha}{l \times c}$$

t = temperatura en $^{\circ}\text{C}$

λ = longitud de onda incidente

α = rotación óptica observada

l = longitud de la celda en decímetros

c = concentración ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de solución)

Pureza óptica:

Se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza óptica (\%)} = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_0} \times 100$$

$[\alpha]$ = actividad óptica observada

$[\alpha]_0$ = actividad óptica máxima

Espectroscopía Infrarroja (IR):

Los espectros se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo: Spectrum BX. Las muestras se disolvieron en metanol Aldrich 99.9% A.C.S. grado espectrofotométrico, y se depositaron en película sobre celdas de KBr.

Espectrometría de masas (EM):

Los espectros de baja resolución se realizaron en un espectrómetro Voyager (Thermoquest), por inyección directa de las muestras o mediante un cromatógrafo de gases. Los espectros de alta resolución se realizaron en espectrómetros Kratos MS 80RFA y VG Autospec-Q.

Para los espectros de ESI-MS se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrómetro de masas de marca THERMO, modelo LCQ, empleando ionización de tipo electrospray (ESI), en modo positivo y negativo. Los parámetros instrumentales para

los espectros de masas ESI-MS son los siguientes: voltaje del cono, 4.6 KV; voltaje del capilar, 25 V; temperatura de desolvatación, 220 °C; gas de desolvatación, N₂, cono y nebulización.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

Los experimentos se realizaron en los aparatos Gemini-300 MHz e Inova-400 MHz, a temperatura ambiente (25 °C).

Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). Los valores de δ están referenciados con respecto al pico residual de cloroformo, metanol y benceno para protón a 7.25, 5.30 y 7.15 ppm, respectivamente, y para carbono a 77.0, 49.0 y 128.0 ppm, respectivamente.

La multiplicidad de las señales se indica con las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), m (multiplete), dd (doblete de doblete), dt (doblete de triplete), ddd (doblete de doblete de doblete), etc. Los multipletes se definen con el valor de δ de su punto medio.

Los tipos de experimentos de RMN realizados fueron los siguientes:

- RMN-¹H.
- RMN-¹³C: se realizaron espectros de desacoplamiento en banda ancha, DEPT (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer) y APT (**A**ttached **P**roton **T**est). De los espectros DEPT y APT se deducen las multiplicidades a las que se hacen referencia (CH₃= cuartete (c); CH₂= triplete (t); CH= doblete (d); C= singlete(s)).
- gCOSY (**g**radient **C**orrelation **S**pectroscopy) (correlación homonuclear ¹H-¹H a través de enlaces).
- Espectros diferencia n.O.e. (**n**uclear **O**verhauser **e**ffect) y NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy), que establece las correlaciones debidas a efectos n.O.e. (correlaciones ¹H-¹H a través del espacio).
- HETCOR (**H**eteronuclear **C**orrelation Spectroscopy) y gHSQC (**g**radient **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) determinan la correlación heteronuclear ¹H-¹³C a través de un enlace, gHMBC (**g**radient **H**eteronuclear

Multiple-Bond Correlation) que establece la correlación heteronuclear a través de dos y/o tres enlaces.

- Determinación de excesos enantioméricos mediante técnicas de RMN utilizando $\text{Eu}(\text{hfc})_3$.^{1,2} El complejo tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato] de europio(III), $\text{Eu}(\text{hfc})_3$, distribuido por Aldrich y utilizado tal como se recibe, $\text{Eu}(\text{hfc})_3$, es un reactivo quiral de cambios de desplazamiento químico.

En la práctica, se disuelve una cantidad conocida del alcohol a estudiar en 0.6 mL de CDCl_3 y se registra su espectro de RMN de ^1H ; a continuación, se adicionan cantidades conocidas del reactivo. Ciertas señales del espectro sufrirán variaciones de desplazamiento químico y se producirá un desdoblamiento de las mismas. Si es estudiada una mezcla racémica, ambas señales desdobladas presentarán la misma integración. Si el compuesto está enantioméricamente enriquecido, la relación entre las integrales desdobladas permite calcular la relación molar entre enantiómeros y, por tanto, los excesos enantioméricos.

I.2. Técnicas cromatográficas.

Cromatografía en capa fina (CCF):

Se realizaron sobre cromatofolios de gel de sílice Merck "Kiesegel 60 F254", con un espesor de 0.25 mm e indicador fluorescente.

La elución de los compuestos en los cromatofolios fue evidenciada, bien por exposición a luz UV (254 y 360 nm), bien empleando un revelador químico de coloración:

- Disolución de ácido sulfúrico, etanol al 96% y vainillina, en proporción 4:29:2 ("vainillina").

¹ Kodess, M. I.; Ezhikova, M. A.; Levit, G. L.; Krasnov, V. P. and Charushin, V. N. "NMR determination of enantiomeric composition of 1-substituted 3-amino-1,2-dicarba-closo-dodecaboranes using $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ ". *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, 2766-2768.

² Hanna, G. M. and Lau-Cam, C. A. "Determination of the optical purity of timolol maleate by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy with a chiral $\text{Pr}(\text{III})$ shift reagent." *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* **1995**, 13, 1313-1319.

- Disolución de ácido sulfúrico, agua y ácido acético en proporción 4:16:80 ("óleum").
- Vapores de iodo.
- Disolución de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (4 g), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (100 g), ácido sulfúrico concentrado (100 mL) y agua (900 mL) ("CAM").

En todos los casos se llevó a cabo un posterior calentamiento de la placa a 500 °C durante unos minutos.

Cromatografía en columna (CC):

Para las columnas a presión atmosférica se utilizó gel de sílice Merck de grano 60-200 micrones; las mezclas a separar se introdujeron disueltas en el mismo eluyente, o bien soportadas sobre gel de sílice y adicionadas en la parte superior de la columna.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Merck-Hitachi LaChrom, equipado con índice de refracción L-7490, bomba L-7100 y un procesador Pentium 90, haciendo uso del programa Borwin, versión 1.21.

Las separaciones se llevaron a cabo en una columna de sílica LiChrospher Si-60 con relleno de 10 μm de 1x25 cm (semipreparativa) o con relleno de 5 μm y dimensiones de 0.4x25 cm (analítica).

La preparación de las muestras se realizó con una pequeña columna de gel de sílice, de dimensiones 0.6x7 cm, para eliminar la línea base y posterior filtrado a través de filtros de nylon Teknokroma de 0.45 μm de tamaño de poro.

Los eluyentes utilizados fueron hexano (He), acetato de etilo (Ae) y mezclas de los mismos, previamente destilados y filtrados sobre filtros Millipore de 0.45 μm de tamaño de poro.

También se empleó el análisis mediante HPLC para la determinación de los excesos enantioméricos de las reacciones enantioselectivas, utilizando para ello una columna analítica quiral de carbamato de celulosa Chiracel OD, Daicel Japan, con el cromatógrafo Elite LaChrom-Hitachi, equipado con detector UV L-2400 y bomba L-2130. Los eluyentes utilizados fueron hexano (He), previamente destilado y filtrado sobre filtros Millipore de

0.45 μm de tamaño de poro, isopropanol (iPrOH Merck, grado HPLC) y mezclas de los mismos. Los excesos enantioméricos fueron calculados por comparación entre las áreas que integran para cada pico.

$$ee (\%) = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} \times 100$$

Para determinar los excesos enantioméricos de los diacetatos **7a** y **7b** se utilizaron las siguientes condiciones de separación:

- Eluyente: hexano/isopropanol al 5%.
- Flujo: 0.8 mL/min.
- Longitud de onda: 254 nm.

Tras numerosos ensayos, se determinó que las mejores condiciones de separación de los correspondientes enantiómeros del alcohol **10** son las siguientes:

- Eluyente: hexano/isopropanol al 0.01%.
- Flujo: 0.5 mL/min.
- Longitud de onda: 278 nm.

I.3. Técnicas microbiológicas.

Medida potenciométrica del pH:

Se empleó un pHmetro modelo micropH 2002 de Crison, de alta resolución y controlado por un microprocesador. El equipo dispone de una sonda de temperatura que realiza una compensación automática del pH en función de la temperatura. Se empleó un electrodo combinado de pH Ingold de tipo estándar modelo 104023311.

Esterilización:

Se realizó en un autoclave Selecta, modelo Autester 4043720, en las condiciones estándar de 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 30 minutos.

Medios de cultivo:

Para el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea* 2100 y *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 se utilizó el medio sólido denominado agar-malta (20 g de extracto de malta, 20 g de glucosa, 1 g de peptona y 20 g de agar en 1 L de agua destilada, pH 6.5-7).

Para el crecimiento del hongo *Colletotrichum acutatum* 364856 se utilizó el medio sólido denominado PDA (4 g de almidón de patata, 20 g de dextrosa y 20 g de agar en 1 L de agua destilada, pH 4.9-5.3). Para el crecimiento en medio líquido se utilizó PDB (4 g de almidón de patata y 20 g de dextrosa en 1 L de agua destilada, pH 4.9-5.3).

Para el crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 en medio líquido se utilizó Czapek Dox (50 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura, 5 g de KH_2PO_4 , 2 g de NaNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada, pH 6.5-7).

I.4. Ensayos de actividad fungiestática mediante la técnica de envenenamiento del medio contra *Botrytis cinerea* 2100 y *Colletotrichum gloeosporioides* 20122.³

En la modalidad que llevamos a cabo se emplea un medio sólido al que, tras ser esterilizado y enfriado a una temperatura de 45-50 °C y cuando todavía está líquido, se le añade el producto objeto del bioensayo, en la cantidad necesaria para conseguir la concentración adecuada. El producto se añade disuelto en una cantidad de etanol^{4,5} o dimetilsulfóxido que no supere, en ningún caso, el 1% del total del medio.

El medio denominado agar-malta es empleado como sustrato para el crecimiento de *B. cinerea*, mientras que en el caso de *C. gloeosporioides* se utiliza PDA. Se toman

³ Patil, I. S.; Kulkarni, S.; Hedge, R. K. "Bioassay of fungicides against *Drechslera sorokiniana* (Sacc)". *Pesticides* **1986**, 20, 30-31.

⁴ Leroux, P.; Gredt, M.C.R. "Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*". *Pestic. Sci.* **1984**, 15, 85-89.

⁵ Rewal, N.; Coley-Smith, J.R.; Sealy-Lewis, H. M. "Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*". *Plant. Pathol.* **1991**, 40, 554-560

alícuotas de 10 mL, a las que se añaden volúmenes de 50 µL de disoluciones del producto a evaluar que permitan establecer concentraciones finales de 25, 50, 100 y 200 ppm. Para los controles se toman alícuotas de 20 mL de medio y se le añaden 100 µL de disolvente correspondiente.

Seguidamente, se vierte el medio con el producto en una placa Petri, de 50 mm (90 mm en el caso de los controles), en condiciones asépticas y, transcurrido el tiempo necesario para su solidificación, se inocula centralmente un disco^{6,7} de 5 mm de diámetro, obtenido de un cultivo de *B. cinerea* o *C. gloeosporioides*, de 24 ó 48 horas de antigüedad respectivamente. Los ensayos se realizan por duplicado con tres réplicas por cada concentración, y se toma como control una preparación cuyo medio sólo contiene la misma cantidad de disolvente que se ha añadido para disolver el producto.

Las placas se cultivan en condiciones de crecimiento óptimo durante un período de 7 días, registrándose diariamente el diámetro promedio de la colonia.

Se presentan los resultados del porcentaje de inhibición para los días que dura el bioensayo y el EC₅₀ para el tercer y quinto días.

El porcentaje de inhibición (I%) se obtiene mediante la aplicación a cada una de las dosis empleadas de la ecuación formulada por Vincent⁸ en 1948:

$$I (\%) = \frac{(C - T)}{(C - T_0)} \times 100$$

I = porcentaje de inhibición

C = diámetro de la colonia control

T = diámetro de la colonia objeto del tratamiento

T₀ = diámetro inicial de la colonia objeto del tratamiento

La concentración efectiva que reduce el crecimiento de la colonia tratada un 50% (EC₅₀) se obtiene a partir de una ecuación obtenida al ajustar los datos de porcentaje de

⁶ Smith, T.A.; Barker, J.H.A.; Jung, M. "Growth inhibition of *Botrytis cinerea* by compounds interfering with polyamine metabolism". *J. Gen. Microbiol.* **1990**, 136, 985-992.

⁷ Fallik, E.; Grinberg, S. "Hinokitiol: a natural substance that controls postharvest diseases in eggplant and pepper fruits". *Postharvest Biol. Technol.* **1992**, 2, 137-144.

⁸ Phillips, J. N. and Vincent, J. M. "Dosage response relationship in mold inhibition". *Nature* **1948**, 161, 210-211.

inhibición vs. concentración, para cada día de interés, mediante el método de mínimos cuadrados. El valor de EC_{50} surge de aplicar cada fórmula para un porcentaje de inhibición del 50%.

I.5. Ensayos de actividad fitotóxica.⁹

Se crecieron plantas de *Phaseolus vulgaris* dentro de un invernadero en macetas con mezclas de abono/arena estandarizadas, y controladas por un periodo de 3 ó 4 semanas a 25 °C.

El compuesto a ensayar se disolvió en una solución acuosa al 40% de acetona, con 10 μ L de Tween 80. La concentración estudiada fue 1000 ppm. También se aplicaron controles con una mezcla de acetona/agua/Tween 80 similar a la utilizada anteriormente.

Mientras, las hojas de la planta fueron esterilizadas con una solución acuosa al 10% de etanol, lavadas con agua estéril y secadas con papel de filtro. La disolución del compuesto en estudio fue colocada en forma de gotas de 10 μ L sobre la superficie de la hoja. Así, cada hoja recibió 5 gotas de control y 5 gotas de la disolución a ensayar. Posteriormente, las plantas tratadas fueron incubadas a 25-28 °C. Este ensayo se realizó por duplicado, siendo el compuesto estudiado el (\pm) gloeosporiol ((\pm)-I).

La evaluación de los resultados se realizó de forma cualitativa, observándose el número de círculos afectados comparados con el total.

I.6. Evaluación de la actividad antioxidante. Actividad atrapadora de radicales libres.¹⁰

Aunque se han descrito un gran número de métodos para la determinación de la actividad atrapadora de radicales libres, el ensayo que emplea el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) ha recibido una gran atención debido a su facilidad de uso y

⁹ Colmenares, A. J.; Aleu, J.; Durán-Patrón, R.; Collado, I. G. and Hernández-Galán, R. "The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*". *J. Chem. Ecol.* **2002**, 28, 997-1005.

¹⁰ Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25–30.

utilidad.¹¹ Este ensayo es el más ampliamente utilizado para la evaluación *in vitro* de la capacidad para atrapar radicales libres.¹⁰ En el ensayo DPPH, la actividad antioxidante de un compuesto se evalúa espectrofotométricamente al monitorizar la disminución de la absorbancia a 515 nm al transformarse el radical DPPH (púrpura) en su forma reducida DPPH-H (amarillo).

El ensayo para determinar la capacidad atrapadora de radicales libres implica la medida de la disminución de la absorbancia a 515 nm que se da cuando el radical DPPH reacciona con el antioxidante. En el presente estudio se utilizó una disolución metanólica 90 μ M de DPPH \cdot (Fluka). La disolución se prepara justo antes de utilizarla y se mantiene todo el tiempo en oscuridad.

La concentración exacta de radical DPPH en cada momento del estudio (ya que es susceptible de degradación) se determina por aplicación de una ecuación lineal obtenida mediante un calibrado (ésta se obtiene a partir de un estudio de regresión lineal, $R^2 = 0.9982$):

$$Abs_{515\text{ nm}} = 25.607 [DPPH\cdot](\text{mg/mL}) + 0.0064$$

El compuesto a ensayar se evalúa respecto a su capacidad atrapadora del radical DPPH a concentraciones finales entre 20 y 10 μ M, en MeOH. Estas medidas fueron realizadas por triplicado para cada concentración. Debido a la degradación de la disolución inicial de radical DPPH, es necesario expresar las concentraciones de los compuestos a ensayar como “número de moles de antioxidante/número de moles de DPPH” (concentración relativa).

Cada muestra, de volumen final 1 mL, se preparó por adición a 950 μ L de la disolución del radical DPPH antes mencionada, de 50 μ L de disolución del producto a evaluar en MeOH y mezcla concienzuda, de tal forma que la concentración final de la muestra sea la deseada. Para los controles negativos se empleó metanol (50 μ L).

¹¹ Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols”. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 76, 270-276.

Inmediatamente después de preparar las disoluciones, tanto de los compuestos a ensayar como de los controles negativos, se incuban en oscuridad a 25°C. Las absorbancias de éstas se miden, a 515 nm, inmediatamente y cada 10 minutos, durante 120 minutos, momento en el que la reacción alcanza el estado estacionario (tiempo para el que el porcentaje de DPPH remanente no continúa disminuyendo).

La capacidad atrapadora de radicales libres para el compuesto de interés fue determinada como el porcentaje de reducción de la absorción del radical DPPH• por el compuesto a evaluar.

$$I (\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

I = porcentaje de inhibición del radical DPPH

A₀ = absorbancia del control negativo

A = absorbancia del compuesto, para cada tiempo "t"

Para cada concentración evaluada, se representan las correspondientes cinéticas de reacción. A partir de estos gráficos, se determina el porcentaje de radical DPPH remanente en el estado estacionario, y estos valores se transfieren a otra gráfica en la que se representa el porcentaje de radical DPPH remanente en función de la relación molar entre el antioxidante y DPPH•.

La actividad antirradicalaria se define como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir un 50% la concentración efectiva de radical DPPH, EC₅₀.

Por conveniencia, definiremos "poder antirradicalario" (ARP) como el inverso de EC₅₀ (1/EC₅₀); así, a mayor valor de ARP, mayor será la eficacia del antioxidante.

La estequiometría de la reacción se estima multiplicando el valor de EC₅₀ del antioxidante por dos (2xEC₅₀), lo que proporciona la concentración efectiva teórica del compuesto necesaria para reducir un 100% la concentración de radical DPPH; mientras que su inverso (1/2EC₅₀), indica el número de moles de radical DPPH reducidos por un mol de antioxidante.

II. AISLAMIENTO DE METABOLITOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*
20122. AISLAMIENTO DE ((-)-(2S(R),3S(R),4R(S))-2-(3',4'-DIACETOXIFENIL)-3,4-DIACETOXITETRAHIDROFURANO ((-)-Ia).

En el laboratorio, los cultivos del patógeno se mantuvieron sobre medio sólido tipo agar-malta, a una temperatura de 25 °C, con iluminación permanente mediante luz difusa, obtenida con lámparas fluorescentes.

El hongo se creció en medio líquido estéril de tipo Czapeck-Dox, en agitación a 140 rpm, a una temperatura de 25 °C, con iluminación permanente mediante luz difusa, obtenida con lámparas fluorescentes, durante 7 días. Ya que no se disponía de conidios para realizar la inoculación, se optó por efectuarla mediante la adición de trozos pequeños de micelio y medio de cultivo sólido, de un tamaño aproximado de 3x3x5 mm.

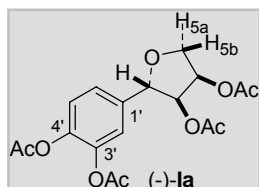
Todo el material que se utilizó fue esterilizado antes de realizar la inoculación del hongo, tanto los medios de cultivo como el material de vidrio.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, el micelio se separó del caldo de cultivo por filtración a presión reducida, usando un filtro Nyltal de 200 µm de poro y CELITE® 545.

La extracción de los metabolitos excretados por el hongo en los medios de cultivo se realizó a partir de los filtrados libres de micelio, utilizando acetato de etilo destilado. Tras secado sobre sulfato sódico anhidro, filtración y evaporación del disolvente a presión reducida, se obtuvo un extracto crudo (9.3 g), que fue sometido a fraccionamiento posterior mediante la separación por cromatografía en columna con disolventes de polaridad creciente, utilizando la siguiente secuencia: hexano, diclorometano, acetato de etilo y, finalmente, metanol.

La fracción correspondiente a acetato de etilo fue acetilada (Ac₂O/piridina) y, tras su purificación, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se obtuvo el compuesto (-)-Ia (4 mg).

II.1. (-)-(2S(R),3S(R),4R(S))-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((-)-Ia).



Aceite viscoso amarillo.

HPLC: Tiempo de retención de 45 minutos, en He:Ae (70:30) con flujo de 1.1 mL/min., en columna analítica de gel de sílice.

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.5 mg/mL CHCl₃): - 34°.

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2936 (ν C=C-H); 2861 (ν C-C-H); 1768, 1747 (ν C=O); 1231 (ν C-O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.09 (s, 3H, H₃-acetato en C-4), 2.11 (s, 3H, H₃-acetato en C-3), 2.28 (s, 6H, 2 H₃-acetato en C-3' y C-4'), 3.97 (dd, J = 4.0, 10.3 Hz, 1H, H-5a), 4.43 (dd, J = 5.3, 10.3 Hz, 1H, H-5b), 4.94 (dd, J = 6.9, 0.6 Hz, 1H, H-2), 5.03 (dd, J = 5.2, 6.9 Hz, 1H, H-3), 5.41 (ddd, J = 4.0, 5.2, 5.3 Hz, 1H, H-4), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.23-7.27 (2H, H-2', H-6').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 20.6 (c, acetatos C-3' y C-4'), 20.7 (c, acetatos C-3 y C-4), 71.1 (t, C-5; d, C-4), 77.2 (d, C-2), 80.4 (d, C-3), 120.9 (d, C-5'), 123.6 (d, C-2'), 123.8 (d, C-6'), 137.5 (s, C-1'), 141.8 (s, C-4'), 142.2 (s, C-3'), 168.0 (s, C=O acetato C-4'), 168.2 (s, C=O acetato C-3'), 169.8 (s, C=O acetato C-4), 170.0 (s, C=O acetato C-3).

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 381 [M+1]⁺ (0.5); 320 [M-CH₃COOH]⁺ (38); 278 (46); 261 (82); 219 (90); 176 (98); 137 (100).

EMAR: Observado m/z = 320.0895 C₁₆H₁₆O₇, M-CH₃COOH calculado para m/z = 320.0896.

III. AISLAMIENTO DE METABOLITOS DE *Colletotrichum acutatum* 364856.

En el laboratorio, los cultivos del patógeno se mantuvieron sobre placas de PDA, a una temperatura de 25 °C, con iluminación permanente mediante luz difusa, obtenida con lámparas fluorescentes.

El hongo se creció en medio líquido estéril de tipo PDB, en agitación a 140 rpm, a una temperatura de 25 °C, con iluminación permanente mediante luz difusa, obtenida con lámparas fluorescentes. Ya que no se disponía de conidios para realizar la inoculación, se optó por efectuarla mediante la adición de trozos pequeños de micelio y medio de cultivo sólido, de un tamaño aproximado de 3x3x5 mm.

Se llevaron a cabo dos fermentaciones:

Fermentación	Inóculo	Tiempo de incubación	Volumen	Extracto
1ª	8 trozos de micelio	15 días	6 litros	290 mg
2ª	10 trozos de micelio	14 días	22.5 litros	1864 mg

Todo el material que se utilizó fue esterilizado antes de realizar la inoculación del hongo, tanto los medios de cultivo como el material de vidrio.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, el micelio se separó por filtración a presión reducida, usando un filtro Nyltal de 200 µm de poro.

La extracción de los metabolitos excretados por el hongo en los medios de cultivo se realizó a partir de los filtrados libres de micelio, utilizando acetato de etilo destilado. Tras secado sobre sulfato sódico anhidro, filtración y evaporación del disolvente a presión reducida, se obtuvo un extracto crudo (*figura III.1*), que fue sometido a fraccionamiento posterior mediante la separación por cromatografía en columna con mezclas de polaridad creciente de hexano/acetato de etilo, obteniéndose las fracciones indicadas en la *figura III.2* y *figura III.3*.

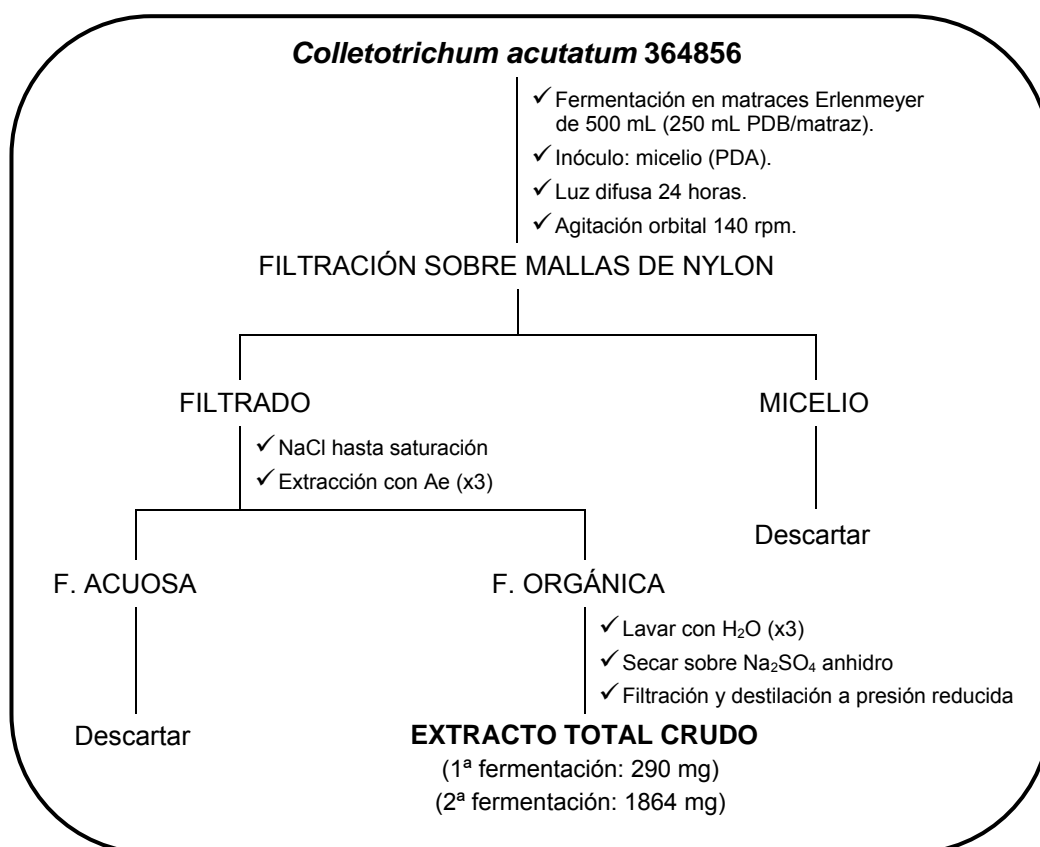


Figura III.1. Diagrama del proceso de extracción de los filtrados de los medios de cultivo de la cepa 364856 de *C. acutatum*.

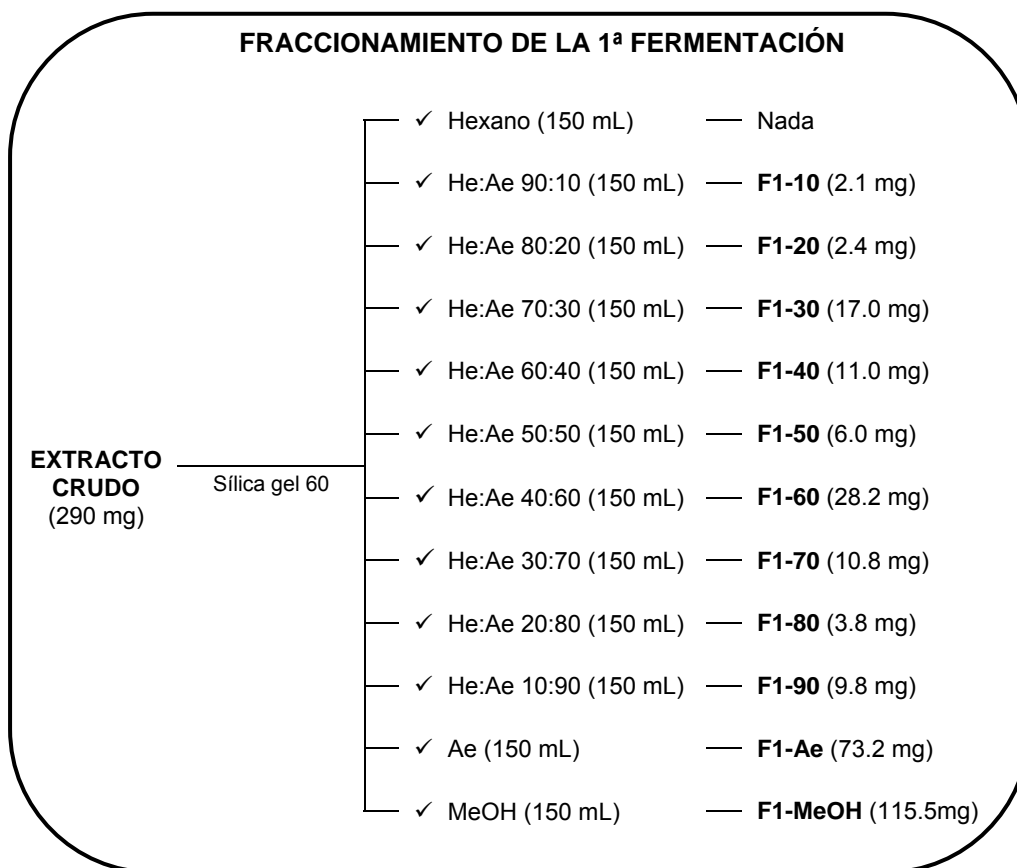


Figura III.2. Diagrama del proceso de fraccionamiento de los extractos crudos obtenidos del medio de cultivo de la 1ª fermentación de *C. acutatum* 364856.

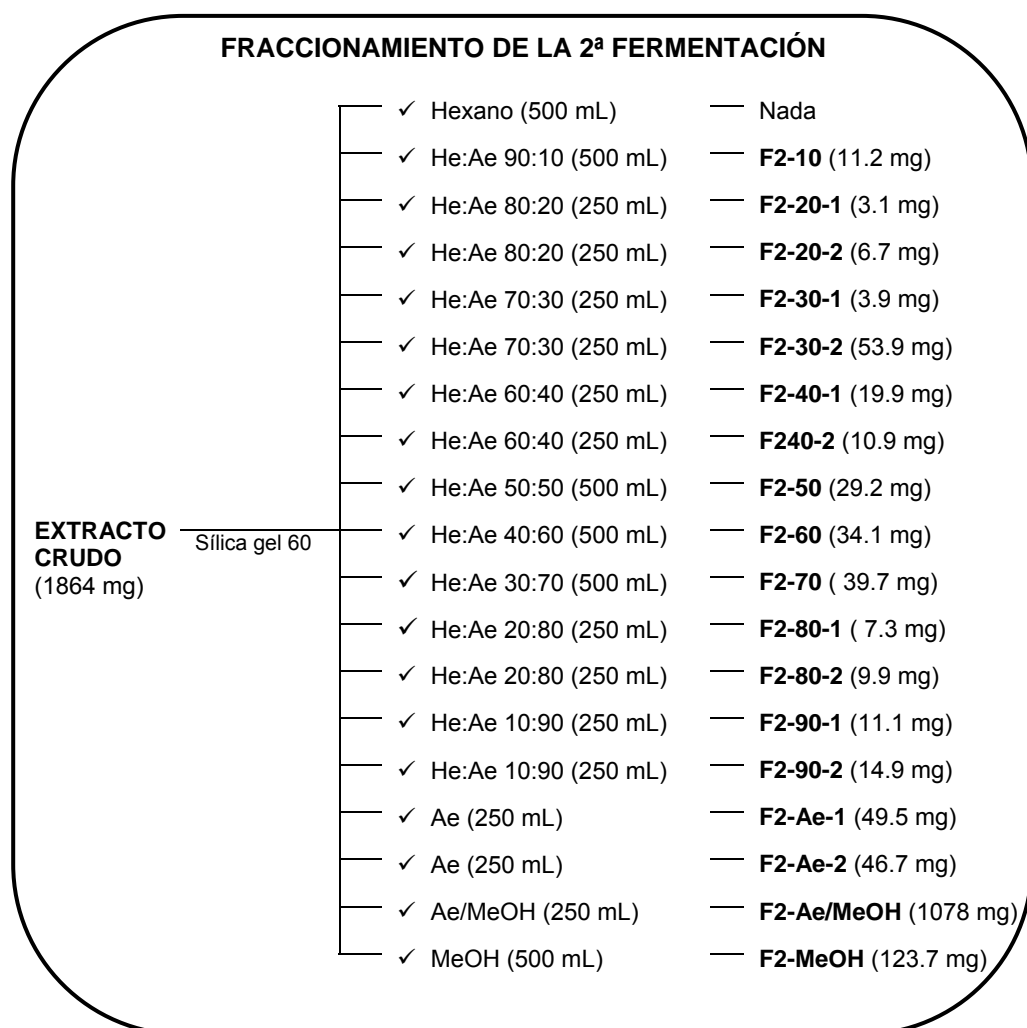


Figura III.3. Diagrama del proceso de fraccionamiento de los extractos crudos obtenidos del medio de cultivo de la 2ª fermentación de *C. acutatum* 364856.

El fraccionamiento de los extractos crudos correspondientes a ambas fermentaciones, mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando gradientes de He:Ae, desde 100:0 hasta 0:100, y MeOH, tal y como se indica en las figuras anteriores, condujo a la obtención de las fracciones indicadas, que fueron estudiadas por RMN de ^1H . Las más interesantes fueron **F1-30**, **F1-50**, **F2-40-2**, **F2-50**,

F2-60 y **F2-70**, y fueron, por tanto, purificadas por HPLC, lo que permitió aislar los metabolitos descritos en la *figura III.4*.

- (-)-Isosclerona¹² (**IX**).
- Tirosol¹³ (**X**).
- Alcohol 4-hidroxibencilico¹⁴ (**XI**).
- (+)-3-hidroxiisosclerona¹⁵ (**XII**).

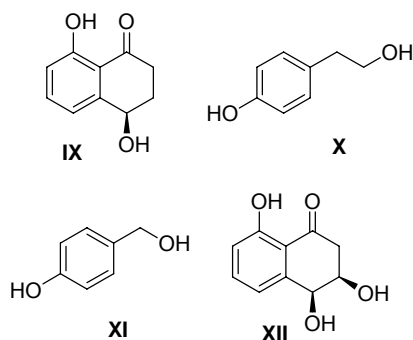


Figura III.4. Metabolitos obtenidos, hasta el momento, de los extractos del filtrado de *C. acutatum* 364856.

¹² Machida, K.; Matsuoka, E.; Kasahara, T. and Kikuchi, M. "Studies on the constituents of *Juglans* species. I. Structural determination of (4*S*)- and (4*R*)-4-hydroxy- α -tetralone derivatives from the fruit of *Juglans mandshurica* MAXIM. var. *sieboldiana* MAKINO". *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 934-937.

¹³ Brenna, E.; Fronza, G.; Fuganti, C. and Pincioli, M. "Differentiation of Natural and Synthetic Phenylalanine and Tyrosine through Natural Abundance ²H Nuclear Magnetic Resonance". *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4866-4872.

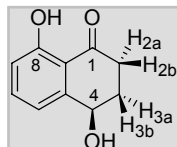
¹⁴ Yang, X.-D.; Zhu, J.; Rong, Y.; Liu, J.-P.; Li, L. and Zhang, H.-B. "Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*". *Nat. Prod. Res., Part A: Structure and Synthesis* **2007**, 21, 180-186.

¹⁵ Krohn, K.; Biele, C.; Drogies, K.-H.; Steingröver, K.; Aust, H.-J.; Draeger, S. and Schulz, B. "Fusidilactones, a new group of polycyclic lactones from an endophyte, *Fusidium* sp". *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2331-2336.

III.1. Caracterización de los metabolitos obtenidos de *C. acutatum* 364856.

III.1.1. (-)-Isosclerona (IX).

Metabolito aislado de las fracciones **F1-30** (3.0 mg) y **F2-40-2** y **F2-50** (3.3 mg).



Aceite amarillo.

HPLC: Tiempo de retención de 58 minutos, en He:Ae (80:20) con flujo de 0.8 mL/min., en columna analítica de gel de sílice.

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.5 mg/mL CHCl₃): -9°.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3395 (ν O-H); 1637 (ν C=O, Ar-CO-R); 1578, 1454 (ν C=C núcleo aromático, Ar-CO); 1245 (ν O-H, fenol).

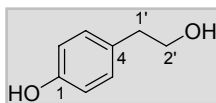
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.88 (s, 1H, OH), 2.18 (dddd, J = 4.7, 8.3, 12.8, 18.0 Hz, 1H, H-3a), 2.34 (dddd, J = 4.7, 8.3, 13.6, 18.0 Hz, 1H, H-3b), 2.64 (ddd, J = 4.7, 8.3, 17.9 Hz, 1H, H-2a*), 3.00 (ddd, J = 4.7, 8.3, 17.9 Hz, 1H, H-2b*), 4.91 (dd, J = 12.8, 13.6 Hz, 1H, H-4), 6.92 (dd, J = 0.8, 8.3 Hz, 1H, H-7), 7.01 (dd, J = 0.8, 7.3 Hz, 1H, H-5), 7.49 (dd, J = 7.3, 8.3 Hz, 1H, H-6), 12.40 (s, 1H, Ar-OH). * Señales intercambiables.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 31.2 (t, C-3), 34.5 (t, C-2), 67.7 (d, C-4), 115.2 (s, C-9), 117.3 (d, C-5), 117.8 (d, C-7), 137.0 (d, C-6), 145.8 (s, C-10), 162.8 (s, C-8), 204.2 (s, C-1). HMBC (selección de correlaciones): C-4 → H-5; C-9 → H-5, H-7, Ar-OH; C-10 → H-6, 2 H-3.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 178 [M]⁺ (78); 150 (22); 121 (100); 77 (16); 65 (25); 51 (14).

III.1.2. Tirosol (X).

Metabolito aislado de las fracciones **F1-50** (1.0 mg), **F2-50** (6.3 mg) y **F2-60** (2.8 mg).



Sólido blanco.

HPLC: Tiempo de retención de 25 minutos, en He:Ae (60:40) con flujo de 0.8 mL/min., en columna analítica de gel de sílice.

Punto de fusión: 91-93 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3402 (ν O-H); 1710, 1635 (ν C=C núcleo aromático).

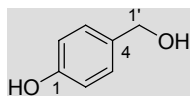
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.79 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H₂-1'), 3.81 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H₂-2'), 6.77 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5).

RMN de ¹³C (100 MHz, CH₃COCH₃): δ (ppm) 38.8 (t, C-1'), 63.6 (t, C-2'), 115.2 (2d, C-2, C-6), 130.0 (2d, C-3, C-5), 130.3 (s, C-4), 155.8 (s, C-1).

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 138 [M]⁺ (15); 107 [M-2 OH]⁺ (100); 77 (30).

III.1.3. Alcohol 4-hidroxibencílico (XI).

Metabolito aislado de las fracciones **F1-50** (0.2 mg) y **F2-60** (0.5 mg).



Sólido blanco.

HPLC: Tiempo de retención de 26 minutos, en He:Ae (60:40) con flujo de 0.8 mL/min., en columna analítica de gel de sílice.

Punto de fusión: 114-116 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3393 (ν O-H); 1716, 1601 (ν C=C núcleo aromático); 1233 (ν O-H, fenol).

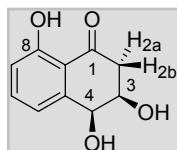
RMN de ¹H (600 MHz, CD₃COCD₃): δ (ppm) 3.89 (t, J = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.49 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H₂-1'), 6.77 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5), 8.15 (s, 1H, Ar-OH).

RMN de ¹³C (150 MHz, CD₃COCD₃): δ (ppm) 64.5 (t, C-1'), 115.7 (2d, C-2, C-6), 129.0 (2d, C-3, C-5), 134.3 (s, C-4), 157.3 (s, C-1).

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 124 [M]⁺ (79); 107 [M-OH]⁺ (100); 95 (68); 77 (75).

III.1.4. (+)-3-hidroxiisosclerona (XII).

Metabolito aislado de las fracciones **F2-60** (1.4 mg) y **F2-70** (4.4 mg).



Aceite amarillo.

HPLC: Tiempo de retención de 63 minutos, en He:Ae (60:40) con flujo de 0.7 mL/min., en columna analítica de gel de sílice.

$[\alpha]_D^{25}$ (c=2.2 mg/mL CHCl_3): +2°.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3381 (ν O-H); 1720 (ν C=O); 1639, 1457 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.86 (dd, J = 3.7, 17.4 Hz, 1H, H-2a), 3.07 (dd, J = 7.4, 17.4 Hz, 1H, H-2b), 4.38 (ddd, J = 2.7, 3.7, 7.4 Hz, 1H, H-3), 4.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.95 (dd, J = 1.0, 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.08 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, 1H, H-7), 7.52 (dd, J = 7.5, 8.4 Hz, 1H, H-6), 12.20 (s, 1H, Ar-OH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 42.6 (t, C-2), 69.1 (d, C-3), 70.1 (d, C-4), 115.3 (s, C-9), 118.1 (d, C-5), 119.0 (d, C-7), 137.2 (d, C-6), 142.4 (s, C-10), 162.4 (s, C-8), 202.0 (s, C-1). HMBC (selección de correlaciones): C-9 \rightarrow H-5, H-7; C-10 \rightarrow H-6; C-8 \rightarrow Ar-OH.

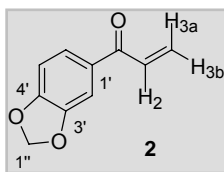
MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 194 $[\text{M}]^+$ (22); 176 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (9); 150 (23); 121 (100); 93 (17); 65 (45).

IV. SÍNTESIS DE (±)-GLOEOSPORIOL ((±)-I).

IV.1. Aproximación utilizando 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (1) como material de partida.

IV.1.1. Preparación de la 3',4'-(metilendioxi)fenil vinil cetona (2).¹⁶

En un matraz Schlenk conectado a un condensador, en atmósfera inerte de nitrógeno, se introducen paraformaldehído (403 mg, 13.43 mmol) y trifluoroacetato de *N*-metililanilinio (1000 mg, 4.48 mmol); a continuación se añade 3',4'-(metilendioxi)fenil metil cetona (1) (500 mg, 2.98 mmol) disuelto en 10 mL de tetrahidrofurano seco. La mezcla se agita a 100 °C durante 24 h. A continuación, se deja enfriar y se añaden 100 mL de éter etílico, lo que induce la precipitación de una goma roja. La fase etérea se separa del polímero en un embudo de decantación y se lava con 50 mL de una disolución saturada de bicarbonato sódico. El polímero se tritura con 50 mL de Et₂O, y esta fase etérea se utiliza para extraer las aguas del lavado anterior. Las dos fases orgánicas se combinan y se secan sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se evapora a presión reducida, obteniéndose 405 mg de crudo de reacción, cuya CCF eluída en Et₂O:He (1:7) muestra la presencia de material de partida y de un producto menos polar, que se purifica en columna sobre gel de sílice eluyendo con Et₂O:He (1:7), obteniéndose 181.1 mg de 2 (rto. 37%).



Aceite anaranjado.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2880, 2771 (ν CH₂-O); 1672 (ν C=O α,β -insaturado), 1638 (ν C=C); 1610, 1498 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 5.16 (s, 2H, H₂-1''), 5.32 (dd, J = 2.1, 10.2 Hz, 1H, H-3a), 6.37 (dd, J = 2.1, 16.9 Hz, 1H, H-3b), 6.45 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.72 (dd, J = 10.2, 16.9 Hz, 1H, H-2), 7.28 (dd, J = 2.0, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-2').

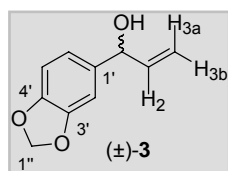
¹⁶ Gras, J. "Methylene ketones and aldehydes by simple, direct methylene transfer: 2-methylene-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene". *Organic Syntheses*, CV 7, 332.

RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 101.6 (t, C-1''), 107.8 (d, C-5'), 108.7 (d, C-2'), 124.9 (d, C-6'), 128.5 (t, C-3), 132.1 (d, C-2), 132.8 (s, C-1'), 148.6 (s, C-3'), 151.9 (s, C-4'), 187.5 (s, C-1).

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 177 $[\text{M}+1]^+$ (20); 176 $[\text{M}]^+$ (32); 149 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3]^+$ (100); 121 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3-\text{CO}]^+$ (19); 97 (30); 69 (33); 57 (54); 55 (43).

IV.1.2. Preparación de (\pm)-1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-en-1-ol ((\pm)-3).^{17,18}

$\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (314.15 mg, 0.84 mmol) es añadido a una disolución del compuesto **2** (148.4 mg, 0.84 mmol) en MeOH (15 mL), y la mezcla se pone en agitación durante 15 minutos. A continuación se adiciona NaBH_4 (37.83 mg, 1 mmol). Tras 30 minutos de reacción, se añaden 50 mL de una disolución acuosa saturada de NH_4Cl , se lava la mezcla con dos porciones de 50 mL de Ae y, finalmente, con salmuera; la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo se obtienen 135.4 mg del producto (\pm)-3 (rto. 91%).



Aceite anaranjado.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3405 (ν O-H); 3076 (ν =C-H); 2886, 2777 (ν CH_2 -O); 1642 (ν C=C); 1609, 1505 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 1.53 (s_a , 1H, OH), 4.78 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H-1), 4.94 (ddd, J = 1.3, 1.3, 10.2 Hz, 1H, H-3b), 5.17 (ddd, J = 1.3, 1.3, 17.2 Hz, 1H, H-3a), 5.28 (s, 2H, H_2 -1''), 5.83 (ddd, J = 5.6, 10.2, 17.2 Hz, 1H, H-2), 6.63 (2H, H-6' y H-5'), 6.88 (s_a , 1H, H-2').

RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 74.9 (d, C-1), 100.9 (t, C-1''), 107.4 (d, C-2'), 108.2 (d, C-5'), 114.1 (t, C-3), 120.0 (d, C-6'), 137.6 (s, C-1'), 141.0 (d, C-2), 147.4 (s, C-4'), 148.2 (s, C-3'); HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2; C-4' \rightarrow H_2 -1'', H-5'; C-3' \rightarrow H_2 -1'', H-2'.

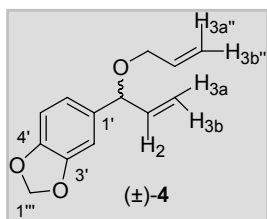
¹⁷ Moreno-Dorado, F. J.; Guerra, F. M.; Aladro, F. J.; Bustamante, J. M.; Jorge, Z. D. and Massanet, G. M. "An easy route to 11-hydroxy-eudesmanolides. Synthesis of (\pm) Decipienin A". *Tetrahedron* **1999**, 55, 6997-7010.

¹⁸ Barluenga, J.; Fañanás, F. J.; Sanz, R.; García, F. and García, N. "New reduction of divinylketones to rearranged polyenyl ethers under Luche conditions". *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 4735-4736.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 178 $[M]^+$ (82); 160 $[M-H_2O]^+$ (8); 151 $[M-C_2H_3]^+$ (30); 149 (44); 135 (43); 123 (50); 103 (48); 93 (90); 65 (100).

IV.1.3. Preparación de (\pm) -1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-enil alil éter $((\pm)$ -4).¹⁹

En un matraz Schlenk se introducen el compuesto (\pm) -3 (205.4 mg, 1.15 mmol) y KOH (71.06 mg, 1.27 mmol), el sistema se somete a tres ciclos de vacío/nitrógeno, para eliminar trazas de humedad y, finalmente, establecer una atmósfera inerte. A continuación, el matraz se sumerge en un baño de hielo y se establece agitación magnética; seguidamente, se añade un exceso de bromuro de alilo (2 mL), gota a gota. Después de 18 horas de reacción, se observa la aparición de un precipitado. La suspensión es filtrada sobre celita y lavada con hexano; la disolución obtenida se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza mediante cromatografía en columna, eluyendo con He:Ae (99:1), obteniéndose 167.8 mg del producto (\pm) -4 (rto. 87%).



Aceite incoloro.

IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3079, 3015 (ν C-H y Ar-H); 2891, 2777 (ν CH_2 -O); 1646 (ν C=C); 1609, 1504 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de 1H (400 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 3.82 (ddd, $J = 1.6, 1.6, 5.3$ Hz, 2H, $H_{2-1''}$), 4.55 (m, 1H, H-1), 5.00 (ddd, $J = 1.5, 1.5, 10.8$ Hz, 1H, H-3b), 5.02 (ddt, $J = 1.6, 1.6, 8.4$ Hz, 1H, H-3b''), 5.19 (ddd, $J = 1.5, 1.5, 17.6$ Hz, 1H, H-3a), 5.24 (ddt, $J = 1.6, 1.6, 16.8$ Hz, 1H, H-3a''), 5.29 (s, 2H, $H_{1-1''}$), 5.82 (m, 1H, H-2''), 5.87 (m, 1H, H-2), 6.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.69 (dd, $J = 1.5, 7.8$ Hz, 1H, H-6'), 6.96 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-2').

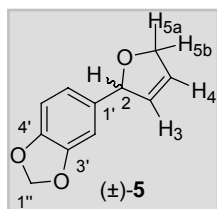
RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 69.0 (t, C-1'), 81.9 (d, C-1), 100.8 (t, C-1'''), 107.6 (d, C-2'), 108.1 (d, C-5'), 115.2 (t, C-3), 115.9 (t, C-3''), 120.6 (d, C-6'), 135.3 (s, C-1'), 135.5 (d, C-2''), 139.5 (d, C-2), 147.4 (s, C-4'), 148.3 (s, C-3'); HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-1; C-4' \rightarrow $H_{2-1''}$, H-5'; C-3' \rightarrow $H_{2-1''}$, H-2'.

¹⁹ Light, J.; Breslow, R. "A water-soluble tin hydride: tris[3-(2-methoxyethoxy)propyl]-stannane". *Organic Syntheses*, CV 9, 733.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 219 $[M+1]^+$ (7); 218 $[M]^+$ (49); 191 $[M-C_2H_3]^+$ (8); 177 $[M-C_3H_5]^+$ (65); 161 (41); 131 (92); 119 (71); 103 (100); 91 (60); 77 (81).

IV.1.4. Preparación de (\pm)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano ((\pm)-5).^{20,21,22,23}

Se disuelve el compuesto (\pm)-4 (154.1 mg, 0.71 mmol) en 15 mL de CH_2Cl_2 seco y desgasificado con argón. A continuación, en atmósfera de argón, se añade el catalizador de Grubbs²⁴ (17.45 mg, 0.02 mmol) y se pone el sistema en agitación y a reflujo. Transcurridas dos horas de reacción, se evapora el disolvente a presión reducida e inmediatamente se realiza una cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla He:Ae (95:5); de este modo se obtienen 120.4 mg del compuesto (\pm)-5 (rto. 89%).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3076 (ν =C-H); 2852, 2780 (ν CH_2 -O); 1681 (ν C=C); 1609, 1505 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de 1H (400 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 4.51 (dddd, J = 0.8, 2.0, 3.6, 12.6 Hz, 1H, H-5a), 4.51 (dddd, J = 1.2, 2.0, 6.0, 12.6 Hz, 1H, H-5b), 5.29 (m, 2H, $H_{2-1''}$), 5.46 (2H, H-3 y H-4), 5.62 (m, 1H, H-2), 6.62 (2H, H-5' y H-6'), 6.84 (m, 1H, H-2').

RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 75.6 (t, C-5), 87.9 (d, C-2), 100.9 (t, C-1''), 107.4 (d, C-2'), 108.2 (d, C-6'), 120.1 (d, C-5'), 126.7 (d, C-4), 130.4 (d, C-3), 137.1 (s, C-1'),

²⁰ Carda, M.; Castillo, E.; Rodríguez, S.; Uriel, S. and Marco, J. A. "Synthesis of conjugated γ - and δ -lactones from aldehydes and ketones via vinylation/allylation-ring closing metathesis-oxidation sequence". *Synlett* **1999**, 10, 1639-1641.

²¹ Delgado, M. and Martín, J. D. "Application of the Grubbs ring-closure olefin metathesis in the synthesis of trans-fused oxacycles". *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 6299-6300.

²² Maier, M. E. and Bugl, M. "Synthesis of spiro ethers by ring closing metathesis". *Synlett* **1988**, 1390-1392.

²³ Seepersaud, M. and Al-Abed, Y. "Total synthesis of carba-D-fructofuranose via a novel metathesis reaction". *Organic Letters* **1999**, 1, 1463-1465.

²⁴ Benziliden-bis(triciclohexilfosfina)-diclororutenio.

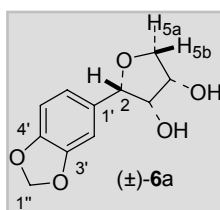
147.6 (s, C-4'), 148.4 (s, C-3'); HMBC (selección de correlaciones): C-4' → H₂-1'', H-6', H-5'; C-3' → H₂-1'', H-2'; C-1' → H-6', H-5', H-2'.

MS (E.I.) *m/z* (intensidad relativa): 190 [M]⁺ (70); 160 (46); 149 (56); 131 (59); 121 [M-C₄H₅O]⁺ (55); 160 (47); 103 (100); 77 (50).

IV.1.5. Preparación de (±)-(2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((±)-**6b**).

A temperatura ambiente, se disuelve el compuesto (±)-**5** (100 mg, 0.53 mmol) en 2 mL de ^tBuOH y se añaden *N*-óxido de trimetilamina (111.39 mg, 1.00 mmol), piridina (0.01 mL) y agua (1.5 mL). A continuación se adiciona una disolución de OsO₄ 2.5% en peso en 2-metil-2-propanol (0.9 mL, 0.01 mmol) y el sistema se pone a reflujo. Tras 24 horas de reacción, se añaden 20 mL de una disolución de bisulfito sódico (20% peso/volumen) y se agita durante 1 hora. Después se evapora el ^tBuOH a presión reducida, se extrae la fase acuosa con Et₂O (3x50 mL); se reúnen las fases orgánicas, se lavan con salmuera (50 mL), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con cloroformo, de este modo se obtienen:

- Aceite incoloro (13.4 mg, rto. 11%) ⇒ (2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)dihidrofurano-3,4-diol ((±)-**6a**).
- Sólido blanco (73.9 mg, rto. 63%) ⇒ (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)dihidrofurano-3,4-diol ((±)-**6b**).



Aceite incoloro.

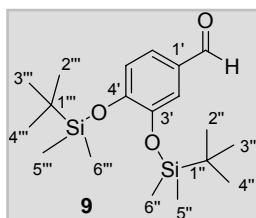
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3383 (ν O-H); 2895, 2781 (ν CH₂-O); 1609, 1505 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 1.78 (s_a, 2H, 2 OH), 3.44 (dd, *J* = 5.6, 7.4 Hz, 1H, H-3), 3.62 (ddd, *J* = 3.4, 4.8, 5.6 Hz, 1H, H-4), 3.67 (dd, *J* = 3.4, 10.0 Hz, 1H, H-5b), 3.87 (dd, *J* = 4.8, 10.0 Hz, 1H, H-5a), 4.54 (d_a, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-2), 5.31 (2H, H₂-1''), 6.66 (d,

IV.2. Síntesis de (±)-gloeosporiol utilizando 3,4-dihidroxibenzaldehído (8) como material de partida.

IV.2.1. Preparación de 3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)benzaldehído (9).²⁵

A una disolución de 3,4-dihidroxibenzaldehído (8) (5000 mg, 36.2 mmol) e imidazol (9858.1 mg, 144.8 mmol) en tetrahidrofurano seco (100 mL), en atmósfera inerte de argón y a 0 °C, se le añade una disolución de cloruro de *tert*-butildimetilsililo 14949.11 mg, 72.4 mmol) en tetrahidrofurano seco (20 mL). Después de 48 horas de reacción, se añade agua y se lava con Et₂O (3x50 mL). Las fases orgánicas se reúnen y se lavan con salmuera; a continuación, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 11533.2 mg del compuesto **9** por purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice del crudo de reacción, utilizando como eluyente una mezcla He:Ae (95:5) (rto. 87%).



Sólido blanco.

Punto de fusión: 39-42 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 1698 (ν C=O); 1592 (ν C=C núcleo aromático); 1256 (δ_s Si-CH₃); 841 (ν Si-CH₃).

RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 0.13 (s, 12H, H₃-5'', H₃-6'', H₃-5''', H₃-6'''), 0.98 (s, 18H, H₃-2'', H₃-3'', H₃-4'', H₃-2''', H₃-3''', H₃-4'''), 6.77 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.11 (dd, J = 1.6, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 7.56 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H-2'), 9.66 (s, 1H, H-1).

RMN de ¹³C (100 MHz, C₆D₆): δ (ppm) -4.14 (c, 4C, C-5'', C-6'', C-5''', C-6'''), 18.6 (s, 2C, C-1'', C-1'''), 25.9 (c, 6C, C-2'', C-3'', C-4'', C-2''', C-3''', C-4'''), 120.6 (d, C-2'), 121.2 (d, C-5'), 125.3 (d, C-6'), 131.8 (s, C-1'), 148.0 (s, C-4'), 153.0 (s, C-3'), 189.7 (d, C-1). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-5'; C-3' → H-2', H-5'; C-4' → H-2', H-5'.

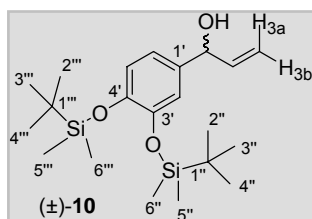
MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 366 [M]⁺ (0.58); 309 (59); 253 (12); 195 (21); 193 (15); 179 (15); 73 (100).

²⁵ Corey, E. J. and Venkateswarlu, A. "Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives". *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6190-6191.

EMAR: Observado $m/z = 366.1993$, calculado para $C_{19}H_{34}O_3$ 366.2046.

IV.2.2. Preparación de (\pm)-1-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil]-prop-2-en-1-ol ((\pm)-10).

En un matraz Schlenk con una barrita agitadora magnética (previamente secados a 120 °C durante 2 horas), bajo atmósfera de argón, se introducen 602.9 mg de magnesio ("magnesium turnings", 24.3 mmol); el sistema se flamea a vacío, y, se añaden unos cristales de yodo. Entonces se deja el sistema en atmósfera inerte de argón y en agitación durante 12 horas. Seguidamente se adiciona, lentamente y bajo atmósfera inerte de argón, una disolución, previamente preparada, del compuesto **9** (2965.1 mg, 8.10 mmol) y bromuro de vinilo en THF (24.3 mL, 24.3 mmol, 1M). Tras 30 minutos de reacción, se añade con cuidado una disolución saturada de cloruro amónico. A continuación se extrae el crudo de reacción con éter etílico (2x50 mL), la fase orgánica se lava con salmuera (50 mL), se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. La purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla He:Ae (96:4), permite obtener 2337.2 mg del producto (\pm)-**10** (rto. 73%).



Aceite amarillo.

IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3350 (ν O-H); 1574 (ν C=C); 1508 (ν C=C núcleo aromático); 1254 (δ_s Si-CH₃); 835, 780 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de 1H (400 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 0.20 (s, 12H, H₃-5'', H₃-6'', H₃-5''', H₃-6'''), 1.04 (s, 18H, H₃-2'', H₃-3'', H₃-4'', H₃-2''', H₃-3''', H₃-4'''), 1.46 (s_a, 1H, OH), 4.88 (dd, $J = 1.6, 4.4$ Hz, 1H, H-1), 4.97 (ddd, $J = 1.6, 1.6, 10.4$ Hz, 1H, H-3b), 5.21 (ddd, $J = 1.6, 1.6, 17.1$ Hz, 1H, H-3a), 5.91 (ddd, $J = 4.4, 10.4, 17.1$ Hz, 1H, H-2), 6.81 (dd, $J = 1.7, 8.1$ Hz, 1H, H-6'), 6.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.07 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2'). *† Señales intercambiables.

RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) -4.00 (q, 2C, C-5''*, C-6''*), -3.99 (q, 2C, C-5'''*, C-6'''*), 18.62 (s, C-1''†), 18.64 (s, C-1'''†), 26.12 (q, 3C, C-2''‡, C-3''‡, C-4''‡), 26.14 (q,

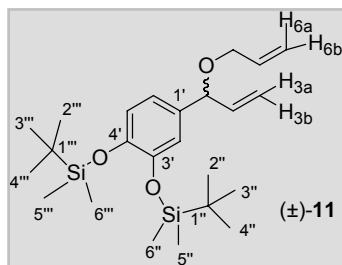
^{13}C , C-2''', C-3''', C-4''', 74.7 (d, C-1), 114.0 (t, C-3), 119.9 (d, C-2'), 120.0 (d, C-5'), 121.3 (d, C-6'), 137.1 (s, C-1'), 141.3 (d, C-2), 146.6 (s, C-3'), 147.3 (s, C-4'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-1; C-3' \rightarrow H-2'. *†# Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 394 $[\text{M}]^+$ (4); 337 (12); 247 (7); 205 (100); 73 (90).

EMAR: Observado m/z = 394.2359, calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{Si}_2$ 394.2355.

IV.2.3. Preparación de (\pm)-1-[(3',4'-bis-(*terc*-butildimetilsilanilo)fenil)]-prop-2-enil alil éter ((\pm)-11).

En atmósfera inerte de argón y a 0 °C, se disuelve el compuesto (\pm)-10 (3575.6 mg, 9.08 mmol) en tetrahidrofurano seco (50 mL). A continuación se añade bis-(trimetilsilil)-amiduro de litio ((TMS)₂NLi) (9.98 mL, 9.98 mmol, 1M) y se agita durante 15 minutos, antes de adicionar bromuro de alilo (1207.4 mg, 9.98 mmol). En este momento el sistema se pone a reflujo (90 °C). Tras 12 horas de reacción, se añaden 50 mL de una disolución saturada de cloruro amónico, y se extrae con Ae (2x50 mL). Los extractos orgánicos se reúnen, se lavan con salmuera (50 mL), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente He:Ae (97:3). Así se obtienen 2500.0 mg de material de partida y 1158.23 mg del producto (\pm)-11 (rto. 98%).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1509 (ν C=C núcleo aromático); 1255 (δ_{s} Si-CH₃); 840, 781 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de ^1H (300 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 0.17 (s, 6H, H₃-5'', H₃-6''), 0.22 (s, 6H, H₃-5''*, H₃-6''*), 1.03 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 1.04 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 3.88 (m, 2H, H-4a, H-4b), 4.64 (m, 1H, H-1), 5.03 (ddd, J = 1.6, 1.6, 9.6 Hz, 1H, H-3b), 5.05 (ddt, J = 1.6, 1.6, 9.4 Hz, 1H, H-6b), 5.25 (ddd, J = 1.6, 1.6, 17.3 Hz, 1H, H-3a), 5.30 (ddt, J = 1.6, 1.6, 17.2 Hz, 1H, H-6a), 5.88 (m, 1H, H-5), 5.93 (m, 1H, H-2), 6.86 (dd, J = 1.6, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.15 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H-2'). *† Señales intercambiables.

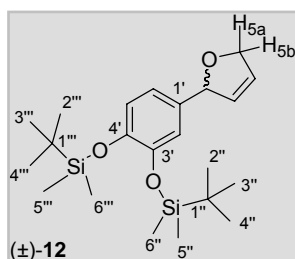
RMN de ^{13}C (75 MHz, C_6D_6): δ (ppm) -4.0 (c, 4C, C-5'', C-6'', C-5''', C-6'''), 18.6 (s, C-1''*), 18.7 (s, C-1'''), 26.09 (c, 3C, C-2'' † , C-3'' † , C-4'' †), 26.14 (c, 3C, C-2''' † , C-3''' † , C-4''' †), 69.1 (t, C-4), 81.9 (d, C-1), 115.3 (t, C-3), 115.8 (t, C-6), 120.2 (d, C-2'), 120.7 (d, C-6'), 121.3 (d, C-5'), 135.1 (s, C-1'), 135.5 (d, C-5), 139.9 (d, C-2), 146.7 (s, C-3' ‡), 147.4 (s, C-4' ‡). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-6', H-2, H-1. * ‡ Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 434 [$\text{M}]^+$ (5); 377 (20); 247 (9); 205 (92); 73 (100).

EMAR: Observado m/z = 434.2673, calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{Si}_2$ 434.2675.

IV.2.4. Preparación de (\pm)-2-[(3',4'-bis-(*terc*-butildimetilsilanilo)fenil]-2,5-dihidrofurano ((\pm)-12).

Se disuelve el compuesto (\pm)-11 (79.1 mg, 0.18 mmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 seco y desgasificado con argón. A continuación, en atmósfera inerte de argón, se añade el catalizador de Grubbs de 1ª generación ($(\text{PCy}_3)_2\text{Cl}_2\text{RuCHPh}$, 30.0 mg, 0.04 mmol) y se pone el sistema en agitación y a reflujo. Transcurridas dos horas de reacción, se evapora el disolvente a presión reducida e inmediatamente se realiza una cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla He:Ae (98:2); de este modo se obtienen 75.8 mg del compuesto (\pm)-12 (rto. 99%).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1509 (ν C=C núcleo aromático); 1255 (δ_s Si-CH₃); 840, 781 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de ^1H (300 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 0.17 (s, 6H, H₃-5''*, H₃-6''*), 0.20 (s, 6H, H₃-5'''*, H₃-6'''*), 1.03 (s, 9H, H₃-2'' † , H₃-3'' † , H₃-4'' †), 1.04 (s, 9H, H₃-2''' † , H₃-3''' † , H₃-4''' †), 4.53 (dddd, J = 1.6, 2.4, 4.0, 12.8 Hz, 1H, H-5a), 4.64 (dddd, J = 1.6, 2.4, 6.0, 12.8 Hz, 1H, H-5b), 5.50 (m, 1H, H-3), 5.58 (m, 1H, H-4), 5.71 (m, 1H, H-2), 6.79 (dd, J = 2.2, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.04 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2'). * † Señales intercambiables.

RMN de ^{13}C (75 MHz, C_6D_6): δ (ppm) -4.02 (c, 2C, C-5''*, C-6''*), -3.95 (c, 2C, C-5''', C-6'''), 18.61 (s, C-1''[†]), 18.64 (s, C-1'''[†]), 26.12 (c, 3C, C-2''[‡], C-3''[‡], C-4''[‡]), 26.16 (c, 3C, C-2'''[‡], C-3'''[‡], C-4'''[‡]), 75.6 (t, C-5), 87.7 (d, C-2), 119.95 (d, C-2'), 120.03 (d, C-6'), 121.4 (d, C-5'), 126.6 (d, C-3), 130.6 (d, C-4), 136.6 (s, C-1'), 146.7 (s, C-4'), 147.3 (s, C-3'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-5', H-2', H-5a[‡] o H-5b[‡]; C-4' \rightarrow H-5', H-6'; C-3' \rightarrow H-2'. *^{†‡} Señales intercambiables.

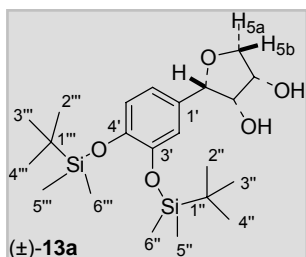
MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 406 $[\text{M}]^+$ (1); 217 (95); 115 (6); 73 (100).

EMAR: Observado m/z = 406.2359, calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{Si}_2$ 406.2372.

IV.2.5. Preparación de (\pm)-2-[(3',4'-bis-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((\pm)-13).

A temperatura ambiente, se disuelve el compuesto (\pm)-12 (302.3 mg, 0.74 mmol) en 2 mL de $^t\text{BuOH}$ y se añaden *N*-óxido de trimetilamina (115.85 mg, 1.04 mmol), piridina (0.01 mL) y agua (1.5 mL). A continuación se adiciona una disolución de OsO_4 2.5% en peso en 2-metil-2-propanol (0.9 mL, 0.01 mmol) y el sistema se pone a reflujo. Tras 24 horas de reacción, se añaden 20 mL de una disolución de bisulfito sódico (20% peso/volumen) y se agita durante 1 hora. Después se evapora el $^t\text{BuOH}$ a presión reducida, se extrae la fase acuosa con Et_2O (3x50 mL); se reúnen las fases orgánicas, se lavan con salmuera (50 mL), se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con cloroformo, de este modo se obtienen:

- Aceite incoloro (38.9 mg, rto. 12%) \Rightarrow (2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-[(3',4'-bis-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((\pm)-13a).
- Sólido blanco (216.8 mg, rto. 67%) \Rightarrow (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-[(3',4'-bis-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((\pm)-13b).



Aceite incoloro.

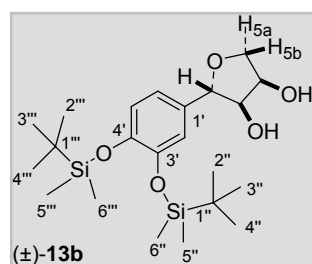
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3400 (ν O-H); 1509 (ν C=C núcleo aromático); 1254 (δ_s Si-CH₃); 840, 781 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de ^1H (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.18 (s, 3H, H₃-5''*), 0.19 (s, 3H, H₃-6''*), 0.20 (s, 6H, H₃-5''*, H₃-6''*), 0.98 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 0.99 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 1.28 (s_a, 2H, 2 OH), 3.82 (dd, $J = 7.0, 8.4$ Hz, 1H, H-5a†), 3.99 (dd, $J = 7.0, 8.4$ Hz, 1H, H-5b†), 4.09 (m, 1H, H-3), 4.46 (ddd, $J = 4.8, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, H-4), 4.78 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-2), 6.81 (2H, H-5', H-6'), 6.97 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2'). *† Señales intercambiables.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CD₃OD): δ (ppm) -3.86 (c, 2C, C-5''*, C-6''*), -3.82 (c, C-5''*), -3.80 (c, C-6''*), 19.3 (s, 2C, C-1''†, C-1''†), 26.5 (c, 3C, C-2''†, C-3''†, C-4''†), 26.6 (c, 3C, C-2''†, C-3''†, C-4''†), 72.5 (d, C-5), 73.5 (t, C-4), 74.1 (d, C-3), 84.6 (d, C-2), 121.5 (d, C-5#), 121.8 (d, C-6#), 122.1 (d, C-2'), 132.5 (s, C-1'), 147.4 (s, C-3'), 147.6 (s, C-4'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2; C-3' → H-2'; C-4' → H-5', H-6'. *†# Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 440 [M]⁺ (53); 405 [M- 2 H₂O]⁺ (4); 385 (25); 367 (30); 323 (50); 293 (30); 237 (68); 209 [M- 2 TBDMS]⁺ (100); 175 (95); 167 (37); 115 (40).

EMAR: Observado $m/z = 440.2433$, calculado para C₂₂H₄₀O₅Si₂ 440.2414.



Sólido blanco.

Punto de fusión: 105-113 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3390 (ν O-H); 1513 (ν C=C núcleo aromático); 1255 (δ_s Si-CH₃); 840, 781 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de ^1H (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.18 (s, 6H, H₃-5''*, H₃-6''*), 0.20 (s, 6H, H₃-5''*, H₃-6''*), 0.98 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 0.99 (s, 9H, H₃-2''†, H₃-3''†, H₃-4''†), 3.82 (m, 1H, H-5a†), 3.85 (m, 1H, H-3), 4.21 (m, 1H, H-4), 4.25 (m, 1H, H-5b†), 4.54 (d, J

= 7.6 Hz, 1H, H-2), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.86 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, 1H, H-6'), 6.89 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-2'). *†† Señales intercambiables.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) -3.89 (c, 2C, C-5''*, C-6''*), -3.83 (c, C-5'''), -3.79 (c, C-6'''), 19.3 (s, C-1''†), 19.4 (s, C-1''†), 26.47 (c, 3C, C-2''‡, C-3''‡, C-4''‡), 26.51 (c, 3C, C-2''‡, C-3''‡, C-4''‡), 72.4 (d, C-4), 74.4 (t, C-5), 79.9 (d, C-3), 83.9 (d, C-2), 120.2 (d, C-2'), 120.4 (d, C-6'), 122.1 (d, C-5'), 135.5 (s, C-1'), 147.6 (s, C-3''#), 148.0 (s, C-4''#). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-3, H-6'. *††# Señales intercambiables.

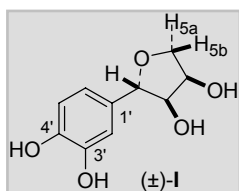
MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 440 $[\text{M}]^+$ (25); 383 (15); 323 $[\text{M} - \text{TBDMS}]^+$ (26); 233 (68); 209 $[\text{M} - 2 \text{TBDMS}]^+$ (72); 179 (100); 175 (36); 115 (56); 103 (24).

EMAR: Observado m/z = 440.2391, calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Si}_2$ 440.2414.

IV.2.6. Preparación de (\pm)-gloeosporiol ((\pm)-I).²⁶

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disuelve el compuesto (\pm)-**13b** (32.6 mg, 0.07 mmol) en 5 mL de una disolución de iodo en metanol al 1% m/v, y el sistema se pone a reflujo. Tras 3 horas de reacción, se comprueba por cromatografía en capa fina que no queda material de partida; entonces se deja enfriar y se añade $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para eliminar el iodo. A continuación se evapora el disolvente, se extrae el residuo con acetato de etilo (3x50 mL) y se lava con salmuera (1x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) eluyendo con una mezcla de hexano/acetona (80:20), permite obtener 5.3 mg del producto (\pm)-**I** (rto. 36%).

²⁶ Vaino, A. R. and Szarek, W. A. "A mild and efficient method for the deprotection of tert-butyldimethylsilyl ethers using iodine in methanol". *Chem. Commun.* **1996**, 2351-2352.



Aceite incoloro.

UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 283.1 nm.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3334 (ν O-H); 1520 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3.80 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H, H-5a), 3.87 (dd, J = 4.2, 7.6 Hz, 1H, H-3), 4.22 (ddd, J = 2.4, 4.2, 4.6 Hz, 1H, H-4), 4.25 (dd, J = 4.6, 8.8 Hz, 1H, H-5b), 4.51 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-2), 6.70 (2H, H-5', H-6'), 6.80 (d, J = 2.0 Hz, H-2').

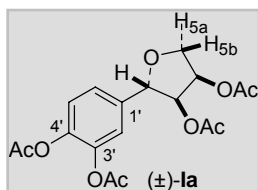
RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 72.4 (d, C-4), 74.2 (t, C-5), 79.6 (d, C-3), 84.5 (d, C-2), 114.4 (d, C-2'), 116.1 (d, C-5'*), 119.0 (d, C-6'*), 133.3 (s, C-1'), 142.1 (s, C-3'*), 146.1 (s, C-4'*). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2. *# Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 212 $[\text{M}]^+$ (73); 194 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (8); 152 (10); 139 $[\text{M}-4\text{H}_2\text{O}]^+$ (100).

EMAR: Observado m/z = 212.0679, calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 212.0685.

IV.2.7. Preparación de 2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((±)-Ia).

En un vial de 10 mL se disuelve el compuesto (±)-I (16.3 mg, 0.08 mmol) en la mínima cantidad posible de piridina seca, y a continuación se añaden 24 equivalentes de anhídrido acético (188.9 mg, 1.85 mmol). Tras 24 h de reacción se añaden 50 mL de Ae, se lava con una disolución de HCl 2N (2x50 mL) y a continuación con una disolución diluida de CuSO_4 (2x50 mL), para comprobar que se ha eliminado el exceso de piridina. Finalmente, se lava con salmuera (50 mL), se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla He:Ae (80:20). De este modo obtenemos 1.6 mg del producto deseado ((±)-Ia) (rto.5.3%).



Aceite viscoso amarillo.

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2936 (ν C=C-H); 2861 (ν C-C-H); 1768,

1747 (ν C=O); 1231 (ν C-O).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4), 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3), 2.28 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3' y C-4'), 3.97 (dd, $J = 4.0$, 10.3 Hz, 1H, H-5a), 4.43 (dd, $J = 5.3$, 10.3 Hz, 1H, H-5b), 4.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-2), 5.03 (dd, $J = 5.2$, 6.9 Hz, 1H, H-3), 5.41 (ddd, $J = 4.0$, 5.2, 5.3 Hz, 1H, H-4), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.23-7.27 (2H, H-2', H-6').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 20.6 (c, 2 $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3' y C-4'), 20.7 (c, 2 $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3 y C-4), 71.1 (t, 2, C-5; d, C-4), 77.2 (d, C-2), 80.4 (d, C-3), 120.9 (d, C-5'), 123.6 (d, C-2'), 123.8 (d, C-6'), 137.5 (s, C-1'), 141.8 (s, C-4'), 142.2 (s, C-3'), 168.0 (s, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4'), 168.2 (s, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3'), 169.8 (s, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4), 170.0 (s, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3).

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 381 $[\text{M}+1]^{++}$ (0.5); 320 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ (38); 278 (46); 261 (82); 219 (90); 176 (98); 137 (100).

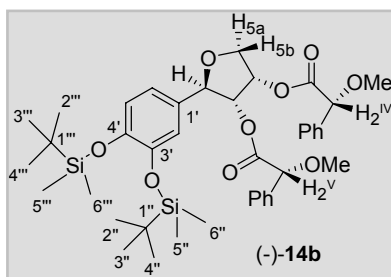
EMAR: Observado $m/z = 320.0895$, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (M- CH_3COOH) 320.0896.

IV.3. Resolución de (±)-gloeosporiol ((±)-I).

IV.3.1. Esterificación con (*R*)-(-)-α-MPA del diol ((±)-13b).^{27,28}

A una disolución de (±)-13b (52.3 mg, 0.12 mmol) en 1 mL de diclorometano seco, se le añade *N*-diciclohexilcarbodiimida (257.5 mg, 1.25 mmol), *N,N*-dimetilaminopiridina (29.0 mg, 0.24 mmol) y ácido (*R*)-(-)-α-metoxifenilacético (44.4 mg, 0.27 mmol). Después de dejar la mezcla en agitación, a temperatura ambiente, durante 1 hora, se evapora el disolvente a presión reducida. La purificación del crudo de reacción en columna de gel de sílice, eluida con He:Ae (90:10), permite obtener los siguientes compuestos diastereoméricos:

- Sólido amorfo blanco (34.4 mg, rto. 39%) ⇒ (-)-14b.
- Sólido amorfo blanco (53.1 mg, rto. 60%) ⇒ (+)-15b.



Sólido amorfo blanco.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2930 (ν OCH₃); 1764, 1298 (ν O-C=O); 1508 (ν C=C núcleo aromático); 1254, 996 (ν C-O-C); 1175 (δ_s Si-CH₃); 840 (ν Si-CH₃).

UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 279.9 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.8 mg/mL MeOH): -21°

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.12 (s, 12H, H₃-5'', H₃-6'', H₃-5''', H₃-6'''), 0.94 (s, 18H, H₃-2'', H₃-3'', H₃-4'', H₃-2''', H₃-3''', H₃-4'''), 3.30 (s, 3H, OMe*), 3.44 (s, 3H, OMe*), 4.00 (d, J = 2.8, 10.6 Hz, 1H, H-5b), 4.09 (s, 1H, H-2^{IV†}), 4.39 (dd, J = 4.8, 10.6 Hz, 1H, H-5a), 4.50 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-2), 4.84 (s, 1H, H-2^{V†}), 4.94 (dd, J = 4.9, 7.7

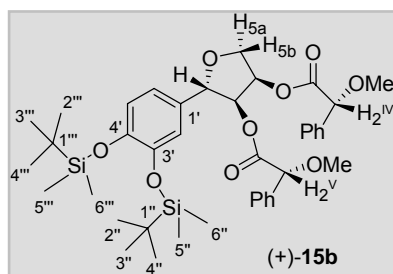
²⁷ Garrido, L.; Zubía, E.; Ortega, M. J.; Naranjo, S. and Salvá, J. "Obscuraminols, new unsaturated amino alcohols from the tunicate *Pseudodistoma obscurum*: structure and absolute configuration". *Tetrahedron* **2001**, 57, 4579-4588.

²⁸ Seco, J. M.; Latypov, Sh. K.; Quiñoá, E. and Rigüera, R. "Determinig Factors in the Assignment of the Absolute Configuration of Alcohols by NMR. The Use of Anisotropic Effects on Remote Positions". *Tetrahedron* **1997**, 53, 8541-8564.

H_z, 1H, H-3), 5.51 (ddd, $J = 2.8, 4.8, 4.9$ Hz, 1H, H-4), 6.07 (dd, $J = 2.3, 8.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.43 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5'), 6.65 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-2'), 7.08 – 7.56 (10H, 2 Ph).^{*†} Señales intercambiables.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -4.1 (c, 4C, C-5'', C-6'', C-5''', C-6'''), 18.4 (s, 2C, C-1'', C-1'''), 25.9 (c, 6C, C-2'', C-3'', C-4'', C-2''', C-3''', C-4'''), 57.2 (c, OMe*), 57.3 (c, OMe*), 70.7 (t, C-5), 70.9 (d, C-4), 77.5 (d, C-3), 81.19 (d, C-2^{IV†}), 81.21 (d, C-2), 82.2 (d, C-2^{V†}), 118.77 (d, C-2[†]), 118.82 (d, C-5[†]), 121.1 (d, C-6[†]), 127.0-129.0 (10C, 2 Ph), 130.8 (s, C-1'), 135.7 (s, C-1 Ph[#]), 136.1 (s, C-1 Ph[#]), 146.9 (s, C-3[‡]), 147.0 (s, C-4[‡]), 169.50 (s, C=O[§]), 169.53 (s, C=O[§]). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2, H-4, H-2', H-5', H-6'; C-1 Ph → H-2^{IV}, H-2^V; C-3', C-4' → H-2', H-5', H-6'. ^{*†‡#§} Señales intercambiables.

MS (ESI) m/z : 759 [M+Na]⁺.



Sólido amorfo blanco.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2928 (ν OCH₃); 1760, 1301 (ν O-C=O); 1510 (ν C=C núcleo aromático); 1260, 993 (ν C-O-C); 1175 (δ_s Si-CH₃); 840 (ν Si-CH₃).

UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 279.9 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ (c=2 mg/mL MeOH): +18°.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.18 (s, 12H, H₃-5'', H₃-6'', H₃-5''', H₃-6'''), 0.97 (s, 18H, H₃-2'', H₃-3'', H₃-4'', H₃-2''', H₃-3''', H₃-4'''), 3.26 (s, 3H, OMe*), 3.37 (s, 3H, OMe*), 3.48 (d, $J = 5.0, 10.3$ Hz, 1H, H-5a), 4.10 (s, 1H, H-2^{IV†}), 4.25 (dd, $J = 5.5, 10.3$ Hz, 1H, H-5b), 4.68 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-2), 4.80 (s, 1H, H-2^{V†}), 5.00 (dd, $J = 5.5, 6.1$ Hz, 1H, H-3), 5.39 (ddd, $J = 5.0, 5.5, 5.5$ Hz, 1H, H-4), 6.74 (3H, H-2', H-5', H-6'), 7.20-7.50 (10H, 2 Ph).^{*†} Señales intercambiables.

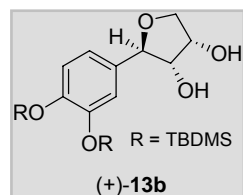
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -4.1 (c, 4C, C-5'', C-6'', C-5''', C-6'''), 18.4 (s, 2C, C-1'', C-1'''), 25.9 (c, 6C, C-2'', C-3'', C-4'', C-2''', C-3''', C-4'''), 57.2 (c, OMe*), 57.3 (c, OMe*), 70.7 (t, C-5), 71.0 (d, C-4), 77.5 (d, C-3), 81.2 (d, 2C, C-2, C-2^{IV†}), 82.2 (d, C-2^{V†}), 118.79 (d, C-2[†]), 118.83 (d, C-5[†]), 121.1 (d, C-6[†]), 127.0-129.0 (10C, 2 Ph), 130.8 (s,

C-1'), 135.7 (s, C-1 Ph[#]), 136.1 (s, C-1 Ph[#]), 146.9 (s, C-3'^{II}), 147.0 (s, C-4'^{II}), 169.50 (s, C=O^S), 169.53 (s, C=O^S). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2, H-4, H-2', H-5', H-6'; C-1 Ph → H-2^{IV}, H-2^V; C-3', C-4' → H-2', H-5', H-6'. *††#§ Señales intercambiables.

MS (ESI) m/z : 759 [M+Na]⁺.

IV.3.2. Preparación de (2*R*,3*R*,4*S*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]-tetrahidrofurano-3,4-diol ((+)-13b).²⁹

Una disolución de (-)-14b (24.4 mg, 0.03 mmol) en metanol (5 mL) es tratada con 2 mL de una disolución acuosa de hidróxido potásico (8.8 mg, 0.13 mmol), a 0°C. Tras 30 minutos de reacción, se evapora el disolvente a presión reducida. La fase acuosa restante se acidifica con HCl 1N, y se extrae con Ae (3x50 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentra. La purificación del crudo de reacción, por cromatografía en columna, utilizando como eluyente He:Ae (60:40), permite obtener el diol (+)-13b enantioméricamente puro (12.0 mg, rto. 92%).



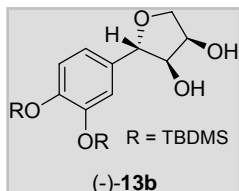
$[\alpha]_D^{25}$ (c=6 mg/mL MeOH): +19°.

IV.3.3. Preparación de (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]-tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-13b).²⁹

Una disolución de (+)-15b (30.7 mg, 0.04 mmol) en metanol (5 mL) es tratada con 2.5 mL de una disolución acuosa de hidróxido potásico (11.0 mg, 0.17 mmol), a 0°C. Tras 2.5 horas de reacción, se evapora el disolvente a presión reducida. La fase acuosa restante se acidifica con HCl 1N, y se extrae con Ae (3x50 mL). La fase orgánica

²⁹ Braun, M. and Gräf, S. "Stereoselective aldol reaction of doubly deprotonated (*R*)-(+)-2-hydroxy-1,2,2-triphenylethyl acetate (HYTRA): (*R*)-3-hydroxy-4-methylpentanoic acid". *Organic Syntheses, Coll. Vol. 9*, p. 497; *Vol. 72*, p.38.

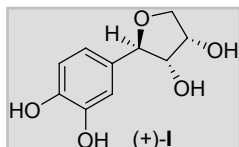
resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción, por cromatografía en columna, utilizando como eluyente He:Ae (60:40), permite obtener el diol (-)-**13b** enantioméricamente puro (5.0 mg, rto. 27%).



$[\alpha]_D^{25}$ (c=2 mg/mL MeOH): -19°.

IV.3.4. Preparación de (+)-(2*R*,3*R*,4*S*)-gloeosporiol ((+)-**I**).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disuelve el compuesto (+)-**13b** (12.1 mg, 0.03 mmol) en 2.5 mL de una disolución de iodo en metanol al 1% m/v, y el sistema se pone a reflujo. Tras 3 horas de reacción, se comprueba por cromatografía en capa fina que no queda material de partida, y entonces se deja enfriar, y se añade Na₂S₂O₃ para eliminar el iodo. A continuación se evapora el disolvente, se extrae el residuo con acetato de etilo (3x50 mL) y se lava con salmuera (50 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) eluyendo con una mezcla de hexano/acetona (80:20), permite obtener 1.9 mg del producto (+)-**I** (rto. 33%).

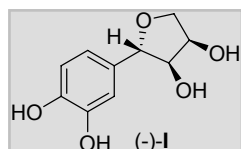


$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.3 mg/mL MeOH): +38°.

IV.3.5. Preparación de (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-gloeosporiol ((-)-**I**).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disuelve el compuesto (-)-**13b** (24.0 mg, 0.05 mmol) en 5 mL de una disolución de iodo en metanol al 1% m/v, y el sistema se pone a reflujo. Tras 3 horas de reacción, se comprueba por cromatografía en capa fina que no queda material de partida, y entonces se deja enfriar, y se añade Na₂S₂O₃ para eliminar el iodo. A continuación se evapora el disolvente, se extrae el

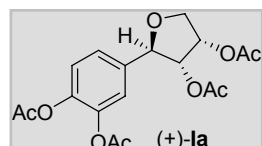
residuo con acetato de etilo (3x50 mL) y se lava con salmuera (50 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) eluyendo con una mezcla de hexano/acetona (80:20), permite obtener 3.7 mg del producto (-)-I (rto. 32%).



$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.85 mg/mL MeOH): -38° .

IV.3.6. Preparación de (+)-(2R,3R,4S)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((+)-Ia).

En un vial de 10 mL se disuelve el compuesto (+)-I (1.4 mg, $6.6 \cdot 10^{-3}$ mmol) en la mínima cantidad posible de piridina seca, a continuación se añaden 24 equivalentes de anhídrido acético (4.04 mg, $3.96 \cdot 10^{-2}$ mmol). Tras 24 h de reacción se añaden 50 mL de Ae y se lava con una disolución de HCl 2N (2x50 mL) y a continuación con una disolución diluída de CuSO_4 (2x50 mL), para comprobar que se ha eliminado el exceso de piridina. Finalmente, se lava con salmuera, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla He:Ae (80:20). De este modo obtenemos 2.4 mg del producto deseado ((+)-Ia) (rto.96%).

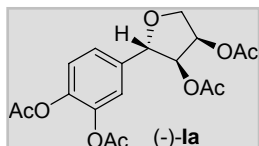


$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.6 mg/mL CHCl_3): $+34^\circ$.

IV.3.7. Preparación de (-)-(2S,3S,4R)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((-)-Ia).

En un vial de 10 mL se disuelve el compuesto (-)-I (2.7 mg, 0.013 mmol) en piridina seca (1 mL), a continuación se añaden 24 equivalentes de anhídrido acético (7.76 mg, 0.076 mmol). Tras 24 h de reacción se añaden 50 mL de Ae y se lava con una disolución de HCl 2N (2x50 mL) y a continuación con una disolución diluída de CuSO_4 (2x50 mL),

para comprobar que se ha eliminado el exceso de piridina. Finalmente, se lava con salmuera (50 mL), se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla He:Ae (80:20). De este modo obtenemos 4.5 mg del producto deseado ((-)-**1a**) (rto.91%).



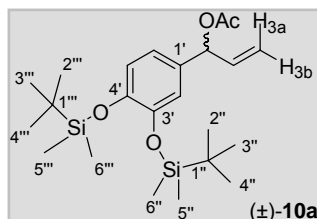
$[\alpha]_D^{25}$ (c=2.3 mg/mL CHCl_3): -34° .

V. APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS ENANTIOSELECTIVA DE (-)-(2S,3S,4R)-GLOEOSPORIOL ((-)-I). DETERMINACIÓN DE LA ESTEREOQUÍMICA ABSOLUTA DE (-)-I.

V.1. Resolución cinética enzimática.

V.1.1. Preparación de acetato de (\pm)-1-[3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil]-3-metil-but-2-enilo ((\pm)-10a).

En un matraz de fondo redondo de 10 mL se disuelve el compuesto (\pm)-**10** (135.0 mg, 0.34 mmol) en la mínima cantidad posible de piridina seca, a continuación se añaden 6 equivalentes de anhídrido acético (210.3 mg, 2.06 mmol). Tras 24 h de reacción, se añaden 50 mL de Ae y se lava con una disolución de HCl 1N (2x50 mL) y a continuación con una disolución diluída de CuSO₄ (2x50 mL), para comprobar que se ha eliminado el exceso de piridina. Finalmente, se lava con salmuera (50 mL), se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo obtenemos 129.0 mg del producto deseado ((\pm)-**10a**) (rto. 87.0%).



Aceite incoloro.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2936 (ν C=C-H); 1768, 1747 (ν C=O); 1574 (ν C=C); 1508 (ν C=C núcleo aromático); 1254 (δ_s

Si-CH₃); 1231 (ν C-O); 835, 780 (γ Si(CH₃)₃).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.18 (s, 12H, H₃-5'', H₃-6'', H₃-5''', H₃-6'''), 0.97 (s, 18H, H₃-2'', H₃-3'', H₃-4'', H₃-2''', H₃-3''', H₃-4'''), 2.08 (s, 3H, -OCOCH₃), 5.21 (dd, J = 1.4, 10.3 Hz, 1H, H-3b), 5.23 (dd, J = 1.4, 16.9 Hz, 1H, H-3a), 5.96 (ddd, J = 5.8, 10.3, 16.9 Hz, 1H, H-2), 6.15 (d, J = 5.8 Hz, 1H, H-1), 6.78 – 6.81 (m, 3H, H-2', H-5', H-6').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -4.1 (c, 4C, C-5'', C-6'', C-5''', C-6'''), 18.4 (s, 2C, C-1'', C-1'''), 21.3 (c, -OCOCH₃), 25.9 (c, 6C, C-2'', C-3'', C-4'', C-2''', C-3''', C-4'''), 75.7 (d, C-1), 116.4 (t, C-3), 120.2 (d, C-2*), 120.4 (d, C-5'*), 120.8 (d, C-6'*), 131.8 (s, C-1'), 136.5 (d, C-2), 146.8 (s, C-3', C-4'), 170.0 (s, -OCOCH₃). HMBC (selección de

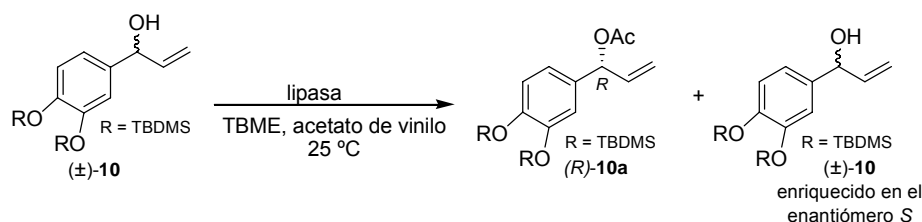
correlaciones): C-1' → H-5', H-1, H-2; C-3', C-4' → H-2', H-5', H-6'. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 436 $[M]^+$ (2); 379 (5); 247 (6); 205 (100); 73 (72).

V.1.2. Resolución enzimática mediante el uso de lipasas.

a) Resolución cinética mediante esterificación con lipasas.

En un procedimiento general, a una disolución del compuesto (\pm)-**8** (64.3.0 mg, 0.16 mmol) en 0.5 mL de *tert*-butil metil éter (TBME), se le añaden 0.01 mL de acetato de vinilo (0.16 mmol, 1 equivalente) y 64.3 mg de enzima PSL (lipasa de *Pseudomonas cepacia*). La suspensión se agita a 25 °C, y la reacción se controla por cromatografía en capa fina (He:Ae 90:10). Después de eliminar la enzima por filtración, el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (He:Ae 95:5). De este modo se obtienen (*R*)-**10a** y el alcohol residual, (\pm)-**10**, ambos enantioméricamente enriquecidos.



En el presente trabajo se han llevado a cabo las reacciones de esterificación con lipasas que se describen en la siguiente tabla.

Entrada	Lipasa	Condiciones de reacción	Acetato (Rto.)	Alcohol recuperado ^a	
				Rto.	ee ^b
1	PPL	TBME, acetato de vinilo, 6 días, 25 °C	-	-	-
2	CRL	TBME, acetato de vinilo, 6 días, 25 °C	-	-	-
3	PSL ³⁰	TBME, 1 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 24 h	12%	46%	3%
4	PSL ³⁰	TBME, 1 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 48 h	39%	42%	3%
5	PSL ³¹	TBME, 10 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 24 h	5%	91%	9%
6	PSL ³¹	TBME, 10 eq. acetato de vinilo, 25 °C, 48h	7%	87%	13%

a) Enriquecido en el enantiómero S; b) exceso enantiomérico determinado por HPLC.

Tabla V.1. Resolución cinética mediante esterificación con lipasas.

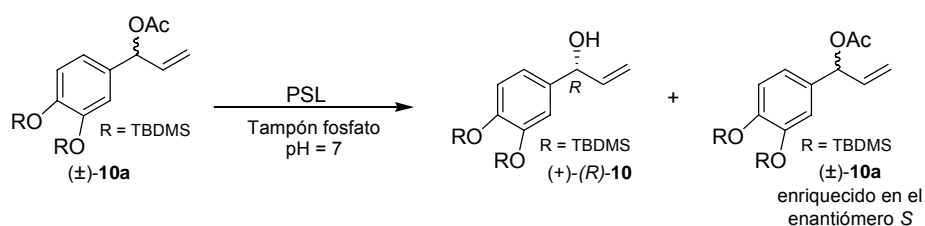
b) Resolución cinética mediante hidrólisis con PSL.³²

En un procedimiento general, a una disolución del compuesto (\pm)-**10a** (128.0 mg, 0.29 mmol) en 11.3 mL de disolvente (mezcla de 1.9 mL de dioxano y 9.4 mL de buffer 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7.0) se le añaden 677.6 mg de enzima PSL (lipasa de *Pseudomonas cepacia*). La suspensión se agita a 25 °C, y la reacción se controla por cromatografía en capa fina (He:Ae 90:10). Después de eliminar la enzima por filtración, se extrae el crudo de reacción con acetato de etilo (3x15 mL), la fase orgánica se lava con salmuera (15 mL), se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (He:Ae 95:5). De este modo se obtienen el alcohol (+)-**R-10** y el acetato residual (\pm)-**10a**, ambos enantioméricamente enriquecidos.

³⁰ Nakano, S.; Igarashi, Y. and Nohira, H. "Lipase-mediated kinetic resolution of cis-1,2-indandiol and the Ritter reaction of its mono-acetate". *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 59-62.

³¹ López-García, M.; Alfonso, I. and Gotor, V. "Highly efficient biocatalytic resolution of *cis*- and *trans*-3-aminoindan-1-ol: Syntheses of enantiopure orthogonally protected *cis*- and *trans*-indane-1,3-diamine". *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3006-3014.

³² Oves, D.; Gotor-Fernández, V.; Fernández, S.; Ferrero, M. and Gotor, V. "Regioselective enzymatic syntheses of C-3 and C-5 carbonate A-ring stereoisomeric precursors of vitamin D". *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2881-2887.



En las siguientes tablas se detallan los resultados obtenidos:

Entrada	Tiempo	T (°C)	Acetato recuperado (Rto.)	Alcohol R	
				Rto.	ee ^a
1	1 h	37 °C	83%	17%	86%
2	2 h	37 °C	75%	14%	94%
3	2.5 h	37 °C	70%	18%	94%
4	3 h	37 °C	36%	19%	79%
5	2.5 h	48 °C	81%	9%	81%
6	3 h	48 °C	51%	7%	93%
7	3.5 h	48 °C	75%	10%	88%

a) Exceso enantiomérico determinado por HPLC.

Tabla V.2. Resolución cinética mediante hidrólisis con PSL.

Entrada	Tiempo	T (°C)	Acetato recuperado (Rto.)	Alcohol R	
				Rto.	ee
1	3 h	25 °C	75%	19%	96% ^a
2	5 h	25 °C	74%	19%	96% ^a
3	6 h	25 °C	53%	34%	98% ^a
4	9 h	25 °C	25%	24%	98% ^a
5	24 h	25 °C	13%	29%	73% ^b

a) Exceso enantiomérico determinado por HPLC; b) exceso enantiomérico determinado por RMN.

Tabla V.3. Resolución cinética mediante hidrólisis con PSL.

V.2. Resolución cinética *vía* dihidroxilación asimétrica de Sharpless.^{33,34}

V.2.1. Tratamiento de (±)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano ((±)-5) con ADmix α .

En un matraz de 10 mL se disuelve el compuesto (±)-5 (72.9 mg, 0.38 mmol) en 4 mL de ^tBuOH/H₂O (1:1), a continuación se añade ADmix α (570 mg) y la mezcla se agita, en oscuridad, durante 5 h. En este momento se añaden 500 mg de sulfito sódico y se agita durante 10 minutos. A continuación se evapora el ^tBuOH a presión reducida y se extrae la fase acuosa con Ae (3x50 mL); se seca la fase orgánica sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo se obtienen 69.7 mg de crudo de reacción. El análisis por CCF de este crudo (He:Ae 1:1), muestra la presencia de material de partida y de un producto mucho más polar, que se purifica en columna sobre gel de sílice, eluyendo con la misma mezcla de eluyentes, obteniéndose 31.4 mg de material de partida (rto. 43%, ee 31.8%) y 24.2 mg de una mezcla de los dioles, que se purifican posteriormente mediante HPLC, utilizando como eluyente una mezcla de He:Ae a la misma polaridad. Así se obtienen, finalmente:

- Aceite incoloro (5.2 mg, rto. 11%, ee 49.7%³⁵) \Rightarrow (-)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-6a), enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=2.3 mg/mL MeOH): -46°).
- Aceite incoloro (11.3 mg, rto. 23%, ee 77.3%³⁵) \Rightarrow (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-6b), enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0 mg/mL MeOH): -43°).

³³ Spivey, A. C.; Hanson, R.; Scoriah, N. and Thorpe, S. J. "Asymmetric Dihydroxylation: Effect of Alkene Structure on Rates and Selectivity". *Journal of Chemical Education* **1999**, 76, 655-659.

³⁴ Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K.; Sung, K.; Hoi, L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M.; Xu, D.; Zhang, X. -L. "The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement". *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768-2771.

³⁵ Los excesos enantioméricos están calculados a partir de los correspondientes diacetatos, descritos en el siguiente apartado.

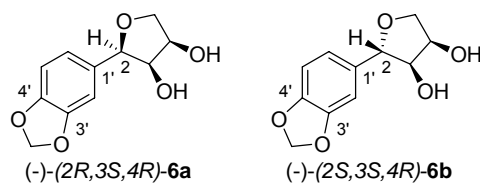


Figura V.1. Estereoquímica absoluta propuesta para los compuestos $(-)\text{-}6a$ y $(-)\text{-}6b$.

V.2.2. Tratamiento de $(\pm)\text{-}2\text{-(}3',4'\text{-(metilendioxi)fenil)-}2,5\text{-dihidrofurano } ((\pm)\text{-}5)$ con ADmix β .

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se disuelven 5.10 g de ADmix β en 20 mL de $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1); se introduce el sistema en un baño de hielo y se protege de la luz. A continuación, se añade el compuesto $(\pm)\text{-}5$ (517.9 mg, 2.73 mmol) disuelto en 5 mL de $t\text{BuOH}$ y después se añaden 5 mL más de H_2O . La mezcla se pone en agitación durante 5 horas. En este momento se retira el baño de hielo, se añaden 830 mg de sulfito sódico y se agita durante 10 minutos. El procedimiento que se sigue a continuación es exactamente igual al descrito anteriormente. Así se obtienen:

- Material de partida (207.8 mg, rto. 40%, ee 26.6%).
- Aceite transparente (19.4 mg, rto. 5%, ee 57%³⁵) $\Rightarrow (+)\text{-}(2S,3R,4S)\text{-}2\text{-(}3',4'\text{-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4\text{-diol } ((+)\text{-}6a)$, enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=0.7 mg/mL MeOH): +28°).
- Aceite transparente (32.3 mg, rto. 9%, ee 65%³⁵) $\Rightarrow (+)\text{-}(2R,3R,4S)\text{-}2\text{-(}3',4'\text{-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4\text{-diol } ((+)\text{-}6b)$, enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=0.8 mg/mL MeOH): +24°).

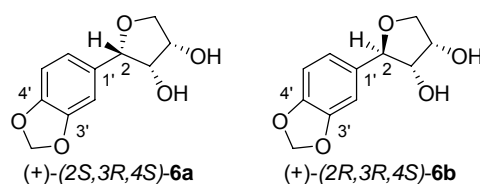
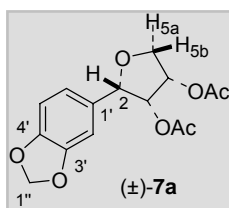


Figura V.2. Estereoquímica absoluta propuesta para los compuestos $(+)\text{-}6a$ y $(+)\text{-}6b$.

V.2.3. Preparación del diacetato de (±)-(2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-(3',4'-(metilendioxi)-fenil)tetrahidrofurano-3,4-diilo ((±)-7a).

En un vial de 10 mL se disuelve (±)-6a (12.2 mg, 0.054 mmol) en la mínima cantidad posible de piridina seca, a continuación se añaden 6 equivalentes de anhídrido acético (33.36 mg, 0.33 mmol). Tras 24 h de reacción se añaden 50 mL de Ae y se lava con una disolución de HCL 2N (2x50 mL) y a continuación con una disolución diluída de CuSO₄ (2x50 mL), para comprobar que se ha eliminado el exceso de piridina. Finalmente, se lava con salmuera, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo obtenemos 12.3 mg del producto deseado ((±)-7a) (rto. 74%).



Aceite transparente.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2884, 2781 (ν CH₂-O); 1742 (ν C=O); 1610, 1504 (ν C=C núcleo aromático); 1240, 1036 (ν C-O-C).

RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 1.60 (s, 3H, CH₃COO- sobre C-3), 1.64 (s, 3H, CH₃COO- sobre C-4), 3.77 (dd, J = 3.4, 10.4 Hz, 1H, H-5b), 3.97 (dd, J = 5.2, 10.4 Hz, 1H, H-5a), 4.92 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H-2), 5.12 (dd, J = 5.2, 7.3 Hz, 1H, H-3), 5.26 (dd, J = 1.2, 1.6 Hz, 2H, H-1''), 5.35 (ddd, J = 3.4, 5.2, 5.2 Hz, 1H, H-4), 6.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 6.78 (dd, J = 1.8, 8.0 Hz, 1H, H-6'), 6.96 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-2').

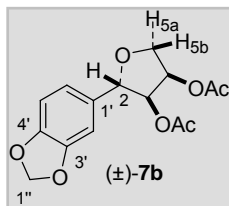
RMN de ¹³C (100 MHz, C₆D₆): δ (ppm) 20.0 (c, CH₃COO- sobre C-3), 20.2 (c, CH₃COO- sobre C-4), 71.0 (t, C-5), 71.7 (d, C-4), 77.7 (d, C-3), 81.2 (d, C-2), 101.1 (t, C-1''), 106.8 (d, C-2'), 108.4 (d, C-5'), 119.9 (d, C-6'), 133.4 (s, C-1'), 148.1 (s, C-3'), 148.6 (s, C-4'), 169.2 (s, C-1''*), 169.3 (s, C-1^{IV}*). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2; C-4' → H₂-1'', H-5'; C-3' → H₂-1'', CH₃COO- sobre C-3; C-4 → CH₃COO- sobre C-4.

* Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 308 [M]⁺ (11); 248 [M-AcOH]⁺ (48); 188 (100); 164 (74); 149 (99); 135 (75); 115 (68); 93 (36); 65 (73); 63 (69).

V.2.4. Preparación del diacetato de (\pm) -(2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)-fenil)tetrahidrofurano-3,4-diilo ((\pm) -7b).

En un vial de 10 mL se disuelve (\pm) -6b (10.5 mg, 0.047 mmol) en la mínima cantidad posible de piridina seca, a continuación se añaden 6 equivalentes de anhídrido acético (28.59 mg, 0.28 mmol). Tras 24 h la reacción había concluido, por lo que se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose 12.7 mg del producto deseado ((\pm) -7b) (rto. 88%).



Aceite transparente.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2890, 2789 (ν $\text{CH}_2\text{-O}$); 1742 (ν C=O); 1610, 1504 (ν C=C núcleo aromático); 1240, 1036 (ν C-O-C).

RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 1.47 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3), 1.61 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4), 3.76 (dd, $J = 7.0, 9.4$ Hz, 1H, H-5b), 3.88 (dd, $J = 5.6, 9.4$ Hz, 1H, H-5a), 4.52 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-2), 5.21 (ddd, $J = 4.8, 5.6, 7.0$ Hz, 1H, H-4), 5.27 (2H, $\text{H}_2\text{-1''}$), 5.44 (dd, $J = 4.8, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 6.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 6.71 (ddd, $J = 1.4, 1.6, 8.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.03 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-2').

RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6): δ (ppm) 19.9 (c, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3), 20.0 (c, $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4), 69.3 (t, C-5), 72.8 (d, C-4), 73.0 (d, C-3), 81.6 (d, C-2), 100.9 (t, C-1''), 107.9 (d, C-5'), 108.3 (d, C-2'), 120.9 (d, C-6'), 130.9 (s, C-1'), 147.6 (s, C-3'), 147.9 (s, C-4'), 168.9 (s, C-1^{IV}), 169.3 (s, C-1'''). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2; C-4' \rightarrow $\text{H}_2\text{-1''}$, H-5'; C-3' \rightarrow $\text{H}_2\text{-1''}$, H-2', $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-3; C-4 \rightarrow $\text{CH}_3\text{COO-}$ sobre C-4; C-1''' \rightarrow $\text{H}_3\text{-2''''}$, H-4; C-1^{IV} \rightarrow $\text{H}_3\text{-2''''}$, H-3.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 308 [M]⁺ (20); 248 [M-AcOH]⁺ (10); 189 (100); 150 (96); 135 (52); 115 (72).

V.2.5. Tratamiento de (\pm) -2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]-2,5-dihidrofurano ((\pm) -12) con ADMix α .

En un matraz de 10 mL se disuelve el compuesto (\pm) -12 (133.8 mg, 0.33 mmol) en 3.6 mL de $t\text{BuOH/H}_2\text{O}$ (1:1), a continuación se añade ADMix α (495 mg) y la mezcla se agita, en oscuridad, durante 24 h. En este momento se añaden 500 mg de sulfito sódico

y se agita durante 10 minutos. A continuación se evapora el ^tBuOH a presión reducida y se extrae la fase acuosa con Ae (3x50 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. De este modo se obtienen 69.7 mg de crudo de reacción. El análisis por CCF de este crudo (He:Ae 1:1), muestra la presencia de material de partida y de dos productos mucho más polares. La purificación en columna sobre gel de sílice, eluyendo con cloroformo, permite obtener:

- Material de partida residual (48.1 mg, rto. 36%) \Rightarrow (2*S*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]-2,5-dihidrofurano ((-)-**12**), enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=16.0 mg/mL MeOH): -2.8°).
- Aceite incoloro (20.1 mg, rto. 14%) \Rightarrow (-)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-**13a**), enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=10.1 mg/mL MeOH): -7°).
- Sólido blanco (31.4 mg, rto. 22%, *ee*³⁶ 47%) \Rightarrow (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahidrofurano-3,4-diol ((-)-**13b**), enriquecido enantioméricamente ($[\alpha]_D^{25}$ (c=15.7 mg/mL MeOH): -9°).

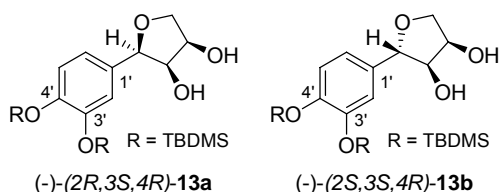


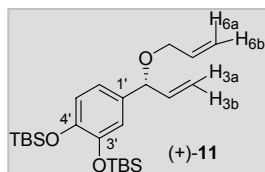
Figura V.3. Estereoquímica absoluta propuesta para los compuestos (-)-**13a** y (-)-**13b**.

³⁶ Calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D$: -19° (Apartado IV.3.3)).

V.3. Preparación de (-)-gloeosporiol ((-)-I).

V.3.1. Preparación de (+)-1-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)fenil)]prop-2-enil alil éter ((+)-11).

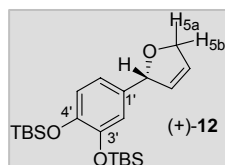
En atmósfera inerte de argón y a 0 °C, se disuelve el compuesto (+)-**10** (290.8 mg, 0.74 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 mL). A continuación se añade bis-(trimetilsilil)-amiduro de litio ((TMS)₂NLi) (0.81 mL, 0.81 mmol, 1M) y se agita durante 15 minutos, antes de adicionar bromuro de alilo (98.0 mg, 0.81 mmol). En este momento el sistema se pone a reflujo (90 °C). Tras 12 horas de reacción, se añaden 20 mL de una disolución saturada de cloruro amónico, y se extrae con Ae (2x50 mL). Los extractos orgánicos se reúnen, se lavan con salmuera, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente He:Ae (97:3). Así se obtienen 163.9 mg de material de partida y 134.7 mg del producto (+)-**11** (rto. 97%).



$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.9 mg/mL MeOH): +18.2°.

V.3.2. Preparación de (+)-(R)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)fenil)]-2,5-dihidrofurano ((+)-12).

Se disuelve el compuesto (+)-**11** (28.5 mg, 0.07 mmol) en 3 mL de CH₂Cl₂ seco y desgasificado con argón. A continuación, en atmósfera inerte de argón, se añade el catalizador de Grubbs de 1ª generación ((PCy₃)₂Cl₂RuCHPh, 10.8 mg, 0.01 mmol) y se pone el sistema en agitación y a reflujo. Transcurridas dos horas de reacción, se evapora el disolvente a presión reducida e inmediatamente se realiza una cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla He:Ae (98:2); de este modo se obtienen 28.1 mg del compuesto (+)-**12** (rto. 99%).

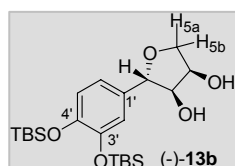


$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.3 mg/mL MeOH): +40.3°.

V.3.3. Preparación de (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]-tetrahydrofurano-3,4-diol ((-)-13b).

A temperatura ambiente, se disuelve el compuesto (+)-12 (20.3 mg, 0.05 mmol) en 2 mL de ^tBuOH y se añaden *N*-óxido de trimetilamina (7.8 mg, 0.07 mmol), piridina (0.01 mL) y agua (1.5 mL). A continuación se adiciona una disolución de OsO₄ 2.5% en peso en 2-metil-2-propanol (0.07 mL, 0.005 mmol) y el sistema se pone a reflujo. Tras 24 horas de reacción, se añaden 20 mL de una disolución de bisulfito sódico (20% peso/volumen) y se agita durante 1 hora. Después se evapora el ^tBuOH a presión reducida, se extrae la fase acuosa con Et₂O (3x30 mL); se reúnen las fases orgánicas, se lavan con salmuera (30 mL), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se realiza por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con cloroformo al 100%, de este modo se obtienen:

- Aceite incoloro (2.6 mg, rto. 12%) ⇒ (-)-(2*S*,3*R*,4*S*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((-)-13a).
- Sólido blanco (15.4 mg, rto. 70%, ee³⁷ 79%) ⇒ (-)-(2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((-)-13b).

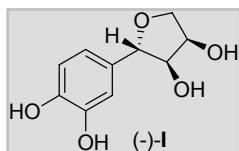


$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.7 mg/mL MeOH): -14.5°.

³⁷ Calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D$: -19° (Apartado IV.3.3)).

V.3.4. Preparación de (-)-(2S,3S,4R)-gloeosporiol ((-)-I).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disuelve el compuesto (-)-**13b** (15.4 mg, 0.04 mmol) en 5 mL de una disolución de iodo en metanol al 1% m/v, y el sistema se pone a reflujo. Tras 3 horas de reacción, se comprueba por cromatografía en capa fina que no queda material de partida, y entonces se deja enfriar, y se añade $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para eliminar el iodo. A continuación se evapora el disolvente, se extrae el residuo con acetato de etilo (3x50 mL) y se lava con salmuera (50 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) eluyendo con una mezcla de hexano/acetona (80:20), permite obtener 3.4 mg del producto (-)-**I** (rto. 40%, ee^{38} 79%).



$[\alpha]_D^{25}$ (c=2.0 mg/mL MeOH): -30° .

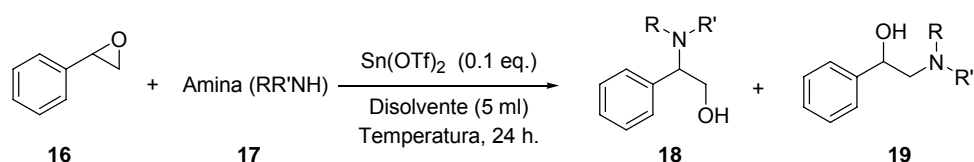
³⁸ Calculado como pureza óptica ($[\alpha]_D$: -38° (Apartado IV.3.5)).

VI. NUEVOS MODELOS DE FUNGICIDAS. SÍNTESIS DE AMINOALCOHOLES MEDIANTE APERTURA REGIOSELECTIVA DE (±)-ÓXIDO DE ESTIRENO CON AMINAS, CATALIZADA POR TRIFLATO DE ESTAÑO (II).

VI.1. Procedimiento típico.

En un matraz Schlenk se introduce (±)-óxido de estireno (204 mg, 1.66 mmol) y la amina correspondiente (3.32 mmol). Tras dejar el sistema en atmósfera inerte de argón, se adicionan 5 mL de acetonitrilo seco y, posteriormente, el triflato de estaño (II) (73 mg, 0.166 mmol). La mezcla se calienta hasta 80 °C y se mantiene en agitación. Transcurridas 24 horas, se pone fin a la reacción evaporando el disolvente a presión reducida. La purificación se realiza mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de hexanos/acetato de etilo desde 90:10 a 0:100 y, finalmente, MeOH.

En la *tabla VI.1* se detallan las condiciones específicas para las aminas empleadas en la apertura de (±)-óxido de estireno.



Amina	Eq.	Disolv.	Temp.	Rto. (%) ^a	Producto
Anilina (17a)	1	CH ₃ CN	25 °C	92	18a:19a (100:0)
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	1	CH ₃ CN	25 °C	68	18b:19b (100:0)
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	2	CH ₃ CN	25 °C	90	18b:19b (100:0)
<i>p</i> -Metoxianilina (17b)	2	CH ₂ Cl ₂	25 °C	42	18b:19b (100:0)
<i>p</i> -Nitroanilina (17c)	1	CH ₃ CN	25 °C	70	18c:19c (100:0)
<i>m</i> -Nitroanilina (17d)	2	CH ₃ CN	25 °C	72	18d:19c (100:0)
<i>o</i> -Nitroanilina (17e)	2	CH ₃ CN	25 °C	56	18e:19e (100:0)
<i>p</i> -Bromoanilina (17f)	2	CH ₃ CN	80 °C	53	18f:19f (100:0)
<i>m</i> -Bromoanilina (17g)	2	CH ₃ CN	25 °C	82	18g:19g (100:0)
<i>o</i> -Bromoanilina (17h)	2	CH ₃ CN	80 °C	70	18h:19h (100:0)
<i>p</i> -Aminobenzoato de metilo (17i)	2	CH ₃ CN	80 °C	80	18i:19i (100:0)
<i>o</i> -Aminobenzoato de metilo (17j)	2	CH ₃ CN	25 °C	83	18j:19j (100:0)
5-Aminoisoftalato de dimetilo (17k)	2	CH ₃ CN	25 °C	64	18k:19k (100:0)
4-Aminotereftalato de dimetilo (17l)	2	CH ₃ CN	25 °C	78	18l:19l (100:0)

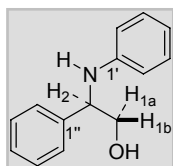
Fenil metil amina (17m)	2	CH ₃ CN	25 °C	82	18m:19m (100:0)
Bencil fenil amina (17n)	1	CH ₃ CN	25 °C	62	18n:19n (100:0)
<i>n</i> -Butilamina (17o)	2	CH ₃ CN	80 °C	n.r. ^b	-
<i>n</i> -Butilamina (17o)	2	CH ₂ Cl ₂	40 °C	68	18o:19o (100:0)
Diisopropilamina (17p)	2	CH ₃ CN	80 °C	n.r. ^b	-
Diisopropilamina (17p)	2	CH ₂ Cl ₂	25 °C	n.r. ^b	-
Diisopropilamina (17p)	2	CH ₂ Cl ₂	40 °C	13	18p:19p (44:56)
<i>t</i> -Butilamina (17q)	2	CH ₃ CN	80 °C	n.r. ^b	-
<i>t</i> -Butilamina (17q)	2	CH ₂ Cl ₂	40 °C	n.r. ^b	-
Bencilamina (17r)	2	CH ₃ CN	25 °C	33	18r:19r (50:50)
Bencilamina (17r)	2	CH ₂ Cl ₂	25 °C	33	18r:19r (51:49)
Bencilamina (17r)	2	CH ₂ Cl ₂	-30 °C	48	18r:19r (51:49)

a) Rendimiento obtenido tras purificación cromatográfica; b) No reacciona.

Tabla VI.1. Condiciones de reacción para la síntesis de aminoalcoholes.

A continuación se describen los datos espectroscópicos de los productos obtenidos mediante la apertura de (±)-óxido de estireno.

VI.1.1. (±)-2-(fenilamina)-2-feniletanol (**18a**).



Aceite marrón.

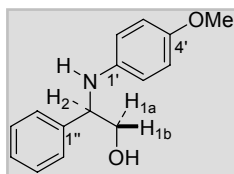
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3398 (ν O-H); 2874 (ν C-H, N-CH); 1602, 1505 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.80 (dd, J = 7.0, 11.1 Hz, 1H, H-1b), 3.95 (dd, J = 4.3, 1.1 Hz, 1H, H-1a), 4.51 (dd, J = 4.3, 7.0 Hz, 1H, H-2), 6.60 (m, 2H, H-2', H-6'), 6.70 (m, 1H, H-4'), 7.10 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.27 (m, 1H, H-4''), 7.31-7.38 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6'').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 59.9 (d, C-2), 67.3 (t, C-1), 113.9 (d, 2C, C-2', C-6'), 117.9 (d, C-4'), 126.7 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.6 (d, C-4''), 128.8 (d, 2C, C-3'', C-5''), 129.1 (d, 2C, C-3', C-5'), 140.1 (s, C-1'), 147.2 (s, C-1''). HMBC (selección de correlaciones): C-1'' \rightarrow H-2'', H-3'', H-5'', H-6'', 2H-1, H-2; C-1' \rightarrow H-3', H-5', H-2; C-2', C-6' \rightarrow H-4'; C-2'', C-6'' \rightarrow H-2. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 213 $[M]^+$ (8); 182 $[M-CH_2OH]^+$ (100); 180 (66); 104 (54); 103 (24); 91 $[C_7H_7]^+$ (22); 77 $[C_6H_5]^+$ (78); 51 (42).

VI.1.2. (\pm)-2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (18b).



Aceite negro.

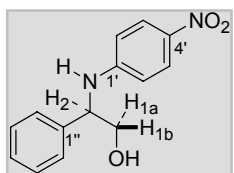
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3387 (ν O-H); 2832 (ν C-H, N-CH); 1512 (ν C=C núcleo aromático); 1033 (ν C-O-C éter).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.69 (s, 3H, OMe), 3.81 (dd, $J = 7.4, 11.2$ Hz, 1H, H-1b), 3.93 (dd, $J = 4.3, 11.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.44 (dd, $J = 4.3, 7.4$ Hz, 1H, H-2), 6.61 (dd, $J = 3.6, 9.0$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.69 (dd, $J = 3.6, 9.0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.25-7.36 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 55.6 (c, OMe), 60.8 (d, C-2), 67.2 (t, C-1), 114.7 (d, 2C, C-3', C-5'), 115.2 (d, 2C, C-2', C-6'), 126.7 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.5 (d, C-4''), 128.7 (d, 2C, C-3'', C-5''), 140.3 (s, C-1''), 141.3 (s, C-1'), 152.3 (s, C-4'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2; C-1'' \rightarrow H-2, 2 H-1; C-4' \rightarrow OMe.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 243 $[M]^+$ (12); 212 $[M-CH_2OH]^+$ (100); 211 (64); 196 (44); 167 (19); 134 (44); 108 $[C_6H_4OMe]^+$ (18); 103 (18); 91 $[C_7H_7]^+$ (21); 77 $[C_6H_5]^+$ (26).

VI.1.3. (\pm)-2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18c).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 99 -102 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3372 (ν O-H); 2940 (ν C-H, N-CH); 1602, 1503 (ν C=C núcleo aromático); 1474 (ν_{as} NO_2).

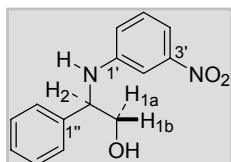
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.85 (dd, $J = 6.0, 11.2$ Hz, 1H, H-1b), 4.03 (dd, $J = 4.0, 11.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.58 (dd, $J = 4.0, 6.0$ Hz, 1H, H-2), 5.48 (s, 1H, NH), 6.48 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.34 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7.99 (m, 2H, H-3', H-5').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 59.2 (d, C-2), 66.9 (t, C-1), 112.2 (d, 2C, C-2', C-6'), 126.2 (d, 2C, C-3', C-5'), 126.5 (d, 2C, C-2'', C-6''), 128.2 (d, C-4''), 129.1 (d, 2C, C-3'', C-5''), 138.4 (s, 2C, C-1', C-1''), 152.5 (s, C-4'). HMBC (selección de

correlaciones): C-1' → H-2', H-6', H-3', H-5'; C-1'' → H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''; C-4' → H-3', H-5'; C-2'', C-6'' → H-2.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 258 $[M]^+$ (8); 228 (16); 227 $[M-CH_2OH]^+$ (100); 226 (14); 195 (28); 181 (56); 180 (32); 152 (10); 103 (22); 91 $[C_7H_7]^+$ (18); 77 $[C_6H_5]^+$ (16); 76 (18). Dato concluyente: pérdida de CH_2OH .

VI.1.4. (±)-2-(3'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18d).



Sólido rojo.

Punto de fusión: 88-92 °C.

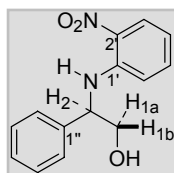
IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3400 (ν O-H); 2932 (ν C-H, N-CH); 1619, 1527 (ν C=C núcleo aromático); 1527 (ν_{as} NO_2).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.60 (s_a , 1H, OH), 3.82 (dd, J = 6.8, 11.2 Hz, 1H, H-1b), 4.00 (dd, J = 4.0, 11.2 Hz, 1H, H-1a), 4.54 (dd, J = 4.0, 6.8 Hz, 1H, H-2), 5.07 (s_a , 1H, NH), 6.81 (ddd, J = 0.7, 2.3, 8.1 Hz, 1H, H-6'), 7.19 (dd, J = 8.2, 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.30 (m, 1H, H-4''), 7.36 (m, 5H, H-2', H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.48 (ddd, J = 0.6, 2.2, 8.0 Hz, 1H, H-4').

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 59.6 (d, C-2), 66.9 (t, C-1), 107.6 (d, C-2'), 112.1 (d, C-4'), 119.3 (d, C-6'), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.9 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 129.6 (d, C-5'), 138.8 (s, C-1''), 148.0 (s, C-1'), 149.0 (s, C-3'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-5'; C-1'' → H-2, 2 H-1, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''; C-2'', C-6'' → H-2; C-3' → H-4', H-2'.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 258 $[M]^+$ (4); 227 $[M-CH_2OH]^+$ (100); 207 (18); 181 (40); 180 (26); 103 (16); 91 $[C_7H_7]^+$ (24); 77 $[C_6H_5]^+$ (14).

VI.1.5. (±)-2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18e).



Aceite rojo.

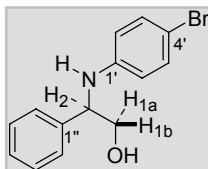
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3372 (ν O-H); 2936 (ν C-H, N-CH); 1618, 1508 (ν C=C núcleo aromático); 1572 (ν_{as} NO₂).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.56 (s_a, 1H, OH), 3.92 (dd, J = 6.7, 11.5 Hz, 1H, H-1b), 4.03 (dd, J = 4.5, 11.5 Hz, 1H, H-1a), 4.71 (ddd, J = 4.5, 6.0, 6.7 Hz, 1H, H-2), 6.62 (m, 2H, H-4', H-6'), 7.20 (m, 1H, H-5'), 7.28 (m, 1H, H-4''), 7.38 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 8.18 (dd, J = 1.6, 8.4 Hz, 1H, H-3'), 8.73 (d, J = 6.0 Hz, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 59.2 (d, C-2), 66.8 (t, C-1), 115.1 (d, C-6'*), 115.8 (d, C-4'), 126.5 (d, 2C, C-2'', C-6''), 126.6 (d, C-3'), 127.9 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 132.3 (s, C-2'), 136.0 (d, C-5'), 138.7 (s, C-1''), 144.6 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2; C-1'' \rightarrow H-2, 2 H-1, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''; C-2'', C-6'' \rightarrow H-2; C-2' \rightarrow H-4', H-6'. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 258 [M]⁺ (2); 227 [M-CH₂OH]⁺ (100); 194 (46); 180 (32); 104 (23); 91 [C₇H₇]⁺ (24); 77 [C₆H₅]⁺ (30).

VI.1.6. (±)-2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18f).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 92-96 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3401 (ν O-H); 2931 (ν C-H, N-CH); 1594, 1497 (ν C=C núcleo aromático); 1072 (ν esqueleto *p*-bromoarilo).

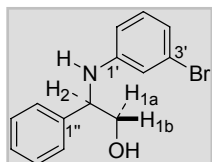
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.78 (dd, J = 6.7, 11.2 Hz, 1H, H-1b), 3.95 (dd, J = 4.1, 11.2 Hz, 1H, H-1a), 4.45 (dd, J = 4.1, 6.7 Hz, 1H, H-2), 6.45 (dd, J = 3.0, 9.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.16 (dd, J = 3.0, 9.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.25-7.34 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 59.7 (d, C-2), 67.2 (t, C-1), 109.4 (s, C-4'), 115.4 (d, 2C, C-2', C-6'), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.7 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 131.8 (d, 2C, C-3', C-5'), 139.5 (s, C-1''), 146.2 (s, C-1'). HMBC (selección de

correlaciones): C-1'' → H-2, 2 H-1; C-1' → H-2, H-2', H-3', H-5', H-6'; C-2'', C-6'' → H-2; C-4' → H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''.

MS (E.I.) *m/z* (intensidad relativa): 291/293 [M]⁺ (7/6); 273/275 (8/7); 260/262 [M-CH₂OH]⁺ (100/70); 207 (14); 182/184 (30/29); 155/157 [C₆H₄Br]⁺ (26/25); 103 (20); 91 [C₇H₇]⁺ (34); 77 [C₆H₅]⁺ (32).

VI.1.7. (±)-2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18g).



Sólido marrón.

Punto de fusión: 81 – 84.5 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3404 (ν O-H); 2877 (ν C-H, N-CH); 1595, 1480

(ν C=C núcleo aromático); 1070 (ν esqueleto *m*-bromoarilo).

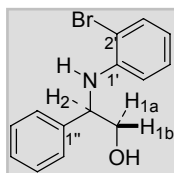
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.61 (s_a, 1H, OH), 3.79 (dd, *J* = 6.6, 11.1 Hz, 1H, H-1b), 3.95 (dd, *J* = 4.2, 11.1 Hz, 1H, H-1a), 4.47 (dd, *J* = 4.2, 6.6 Hz, 1H, H-2), 4.73 (s_a, 1H, NH), 6.47 (ddd, *J* = 0.8, 2.2, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.73 (dd, *J* = 1.9, 2.2 Hz, 1H, H-2'), 6.79 (ddd, *J* = 0.8, 1.9, 7.9 Hz, 1H, H-4'), 6.93 (dd, *J* = 7.9, 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.26-7.37 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 59.5 (d, C-2), 67.1 (t, C-1), 112.2 (d, C-6'), 116.4 (d, C-2'), 120.5 (d, C-4'), 123.0 (s, C-3'), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.7 (d, C-4''), 128.8 (d, 2C, C-3'', C-5''), 130.4 (d, C-5'), 139.4 (s, C-1''), 148.5 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2; C-2'', C-6'' → H-2.

MS (E.I.) *m/z* (intensidad relativa): 291/293 [M]⁺ (5/4); 273/275 (8/6); 260/262 [M-CH₂OH]⁺ (100/80); 182 (24); 180 (23); 155/157 [C₆H₄Br]⁺ (24/20); 103 (20); 91 [C₇H₇]⁺ (38); 77 [C₆H₅]⁺ (32).

EMAR: observado 291.0255 [M]⁺, C₁₄H₁₄NOBr requiere 292.0142.

VI.1.8. (±)-2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18h).



Aceite amarillo.

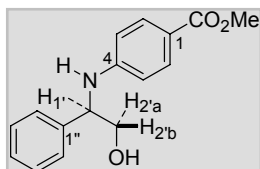
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3398 (ν O-H); 2877 (ν C-H, N-CH); 1597, 1508 (ν C=C núcleo aromático); 1021 (ν esqueleto o-bromoarilo).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.56 (s_a , 1H, OH), 3.75 (dd, $J = 4.4, 7.0$ Hz, 1H, H-1a), 3.90 (dd, $J = 7.0, 10.4$ Hz, 1H, H-1b), 4.47 (dd, $J = 6.0, 10.4$ Hz, 1H, H-2), 5.18 (s_a , 1H, NH), 6.33 (dd, $J = 1.4, 8.0$ Hz, 1H, H-6'), 6.45 (ddd, $J = 1.4, 7.4, 7.9$ Hz, 1H, H-4'), 6.90 (ddd, $J = 1.4, 7.4, 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.18 (m, 1H, H-4''), 7.26 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.33 (dd, $J = 1.4, 7.9$ Hz, 1H, H-3').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 59.8 (d, C-2), 67.3 (t, C-1), 110.3 (s, C-2'), 112.9 (d, C-6'), 118.3 (d, C-4'), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.7 (d, C-4''), 128.3 (d, C-5'), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 132.3 (d, C-3'), 139.4 (s, C-1''), 143.9 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1 \rightarrow H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''; C-1'' \rightarrow H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', 2H-1, H-2; C-1' \rightarrow H-3', H-5'; C-2', C-6' \rightarrow H-4'; C-2'', C-6'' \rightarrow H-2.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 291/293 [$\text{M}]^+$ (6/5); 273/275 (6/5); 260/262 [$\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (100/94); 180 (52); 155/157 [$\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}]^+$ (14/12); 91 [$\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (41); 77 [$\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (42); 76 (26); 65 (18); 51 (20).

VI.1.9. (±)-4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18i).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 93-98.3 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3399 (ν O-H); 2878 (ν C-H, N-CH); 1691 (ν C=O éster); 1605, 1525 (ν C=C núcleo aromático).

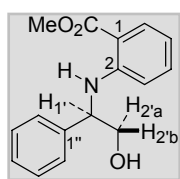
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.80 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.91 (dd, $J = 6.3, 11.2$ Hz, 1H, H-2'b), 3.99 (dd, $J = 4.0, 11.2$ Hz, 1H, H-2'a), 4.56 (dd, $J = 4.0, 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.05 (s_a , 1H, OH), 6.51 (dd, $J = 2.6, 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.22-7.35 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7.77 (dd, $J = 2.6, 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 51.5 (c, CO_2CH_3), 59.2 (d, C-1'), 67.1 (t, C-2'), 112.5 (d, 2C, C-2, C-6), 118.6 (s, C-1), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.8 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 131.3 (d, 2C, C-3, C-5), 139.3 (s, C-1''), 151.1 (s, C-4), 167.4 (s, CO_2Me). HMBC (selección de correlaciones): C-1 \rightarrow H-2, H-6, CO_2CH_3 ; C-1'' \rightarrow H-1', H-2'a, H-2'b; C-4 \rightarrow H-1', H-3, H-5.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 271 $[\text{M}]^+$ (4); 240 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (100); 208 (17); 162 (27); 135 (19); 120 (28); 103 (26); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (27); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (18).

EMAR: observado 271.1200 $[\text{M}]^+$; $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ requiere 271.1208.

VI.1.10. (\pm)-2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18j).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 78-80 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3357 (ν O-H); 2877 (ν C-H, N-CH); 1684 (ν C=O éster); 1581, 1516 (ν C=C núcleo aromático); 1255 (ν C-O-C éster).

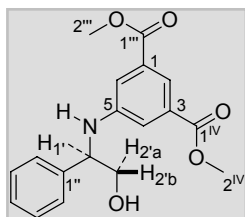
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.63 (s_a , 1H, OH), 3.86 (dd, $J = 6.6, 11.1$ Hz, 1H, H-2'b), 3.90 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.94 (dd, $J = 4.5, 11.1$ Hz, 1H, H-2'a), 4.65 (dd, $J = 4.5, 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 6.49 (dd, $J = 1.1, 8.6$ Hz, 1H, H-3), 6.57 (ddd, $J = 1.1, 7.1, 8.1$ Hz, 1H, H-5), 7.18 (ddd, $J = 1.6, 7.1, 8.6$ Hz, 1H, H-4), 7.26 (m, 1H, H-4''), 7.31-7.38 (4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.91 (dd, $J = 1.6, 8.1$ Hz, 1H, H-6), 8.49 (s_a , 1H, NH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 51.5 (c, CO_2CH_3), 59.1 (d, C-1'), 67.2 (t, C-2'), 110.5 (s, C-1), 112.6 (d, C-3), 115.1 (d, C-5), 126.6 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.4 (d, C-4''), 128.6 (d, 2C, C-3'', C-5''), 131.4 (d, C-6), 134.4 (d, C-4), 139.9 (s, C-1''), 150.2 (s, C-2), 169.1 (s, CO_2CH_3). HMBC (selección de correlaciones): C-2 \rightarrow H-1'; C-1'' \rightarrow H-1', H-2'a, H-2'b; C-2'', C-6'' \rightarrow H-1'.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 271 $[\text{M}]^+$ (3); 253 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ (15); 240 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (52); 224 (24); 208 (100); 180 (23); 151 $[\text{NHC}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{Me}]^+$ (22); 119 (30); 104 (24); 92 (24); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (40); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (36).

EMAR m/z : observado 271.1215 $[\text{M}]^+$; $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ requiere 271.1208.

VI.1.11. (±)-3-metoxycarbonil-5-(1'-fenil-2-hidroxi-etilamino)benzoato de metilo (18k).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 136-141 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3386 (ν O-H); 2871 (ν C-H, N-CH); 1718 (ν C=O éster); 1605, 1438 (ν C=C núcleo aromático); 1246, 1024 (ν C-O-C éster).

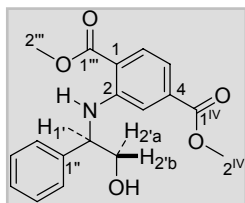
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.21 (s_a, 1H, OH), 3.81 (dd, J = 6.7, 11.2 Hz, 1H, H-2'b), 3.86 (s, 6H, H₃-2''', H₃-2'''), 3.97 (dd, J = 4.1, 11.2 Hz, 1H, H-2'a), 4.60 (dd, J = 4.1, 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.84 (s_a, 1H, NH), 7.27 (m, 1H, H-4''), 7.35 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.41 (d, J = 1.6 Hz, 2H, H-4, H-6), 7.96 (dd, J = 1.4, 1.4 Hz, 1H, H-2).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 52.2 (c, C-2''', C-2'''), 59.5 (d, C-1'), 67.0 (t, C-2'), 118.5 (d, 2C, C-4, C-6), 119.7 (d, C-2), 126.7 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.8 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 131.1 (s, 2C, C-3, C-5), 139.2 (s, C-1''), 147.5 (s, C-5), 166.7 (s, 2C, C-1''', C-1''). HMBC (selección de correlaciones): C-1'' → H-1', 2 H-2'; C-5 → H-1'; C-2'', C-6'' → H-1'; C-1''', C-1'' → 3 H-2''', 3 H-2'', H-4, H-6. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 329 [M]⁺ (3); 311 (10); 298 [M-CH₂OH]⁺ (100); 281 (20); 220 (18); 209 (19); 207 [NHC₆H₄(CO₂Me)₂]⁺ (48); 193 [C₆H₄(CO₂Me)₂]⁺ (17); 178 (20); 150 (10); 133 (12); 103 (16); 91 [C₇H₇]⁺ (33); 77 [C₆H₅]⁺ (14).

EMAR: Observado m/z = 329.1291 (1.92) C₁₈H₁₉NO₅, calculado para m/z = 329.1263.

VI.1.12. (±)-4-metoxycarbonil-2-(1'-fenil-2-hidroxi-etilamino)benzoato de metilo (18l).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 147-149 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3358 (ν O-H); 2877 (ν C-H, N-CH); 1691 (ν C=O éster); 1578, 1450 (ν C=C núcleo aromático); 1245 (ν C-O-C éster).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.81 (s, 3H, H₃-2'''), 3.89 (dd, J = 6.8, 11.2 Hz, 1H, H-2'b), 3.92 (s, 3H, H₃-2'''), 3.98 (dd, J = 6.4, 6.8 Hz, 1H, H-2'a), 4.74 (dd, J = 6.4,

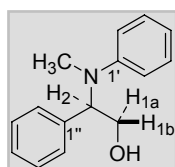
11.2 Hz, 1H, H-1'), 7.17 (dd, $J = 1.4, 8.4$ Hz, 1H, H-5), 7.22 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-3), 7.26 (m, 1H, H-4''), 7.36 (4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 8.55 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 51.9 (c, C-2^{IV}), 52.2 (c, C-2'''), 58.9 (d, C-1'), 67.2 (t, C-2'), 113.76 (d, C-3), 113.83 (s, C-1), 115.6 (d, C-5), 126.7 (d, 2C, C-2'', C-6''), 127.8 (d, C-4''), 128.9 (d, 2C, C-3'', C-5''), 131.7 (d, C-6), 134.9 (s, C-4), 139.4 (s, C-1''), 150.0 (s, C-2), 166.6 (s, C-1^{IV}), 168.7 (s, C-1'''). HMBC (selección de correlaciones): C-1'' \rightarrow H-1'; C-2 \rightarrow H-1'; C-1 \rightarrow C-2'''; C-4 \rightarrow C-2^{IV}; C-2'', C-6'' \rightarrow H-1'; C-1''' \rightarrow H-6; C-1^{IV} \rightarrow H-3, H-5.

E.M. (E.I.) m/z (intensidad relativa): 329 $[\text{M}]^+$ (2); 311 (9); 298 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (72); 266 (100); 238 (14); 207 $[\text{NHC}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{Me})_2]^+$ (21); 177 (34); 150 (16); 119 $[\text{PhCHCH}_2\text{OH}]^+$ (18); 104 (22); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (38); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (18).

EMAR: observado 329.1280 $[\text{M}]^+$; $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ requiere 329.1263.

VI.1.13. (\pm)-2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (18m).



Aceite amarillo.

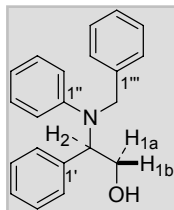
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3398 (ν O-H); 2816 (ν C-H para NMe); 1598, 1504 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.09 (s, 3H, OH), 2.71 (s, 3H, Me), 4.13 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 2H, 2 H-1), 5.08 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H, H-2), 6.82 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.24 – 7.35 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 31.9 (c, Me), 61.6 (t, C-1), 64.2 (d, C-2), 114.3 (d, 2C, C-2', C-6'), 117.9 (d, C-4'), 127.0 (d, 2C, C-3', C-5'), 127.3 (d, C-4''), 128.4 (d, 2C, C-2'', C-6''), 129.1 (d, 2C, C-3'', C-5''), 137.9 (s, C-1'), 150.9 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow Me; C-2 \rightarrow Me. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 227 $[\text{M}]^+$ (5); 209 (36); 196 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (100); 180 (24); 106 $[\text{MeNPh}]^+$ (58); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (66); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (68).

VI.1.14. (±)-2-(bencilfenilamino)-2-feniletanol (18n).



Aceite anaranjado.

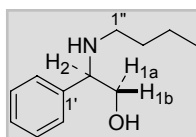
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3413 (ν O-H); 2883 (ν C-H, N-CH); 1598, 1502 (ν C=C núcleo aromático); 1451 (δ CH₂-Ar).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4.07 (d, J = 6.8 Hz, 2H, 2H-1), 4.42 (d, J = 17.0 Hz, 1H, CH_a-Ph*), 4.51 (d, J = 17.0 Hz, 1H, CH_b-Ph*), 5.16 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H-2), 6.79 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-4''), 6.88 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.16-7.35 (m, 12H, H-3'', H-5'').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 50.7 (t, C-1), 63.0 (t, CH₂-Ph), 64.9 (d, C-2), 115.7, 118.7, 126.6, 126.8, 127.48, 127.53, 128.7, 129.1 (d, 15C, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'', C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', C-6''') 137.9 (s, C-1'), 139.6 (s, C-1''), 149.5 (s, C-1'''). HMBC (selección de correlaciones): C-1' \rightarrow H-2, 2H-1; C-1'' \rightarrow H-2, 2H-4; C-1''' \rightarrow CH₂-Ph. * Señales intercambiables.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 303 [M]⁺ (2); 285 (20); 272 [M-CH₂OH]⁺ (32); 194 (16); 183 [PhNHCH₂Ph]⁺ (26); 180 (16); 104 (16); 91 [C₇H₇]⁺ (100); 77 [C₆H₅]⁺ (28); 65 (22); 51 (18).

VI.1.15. (±)-2-butilamino-2-feniletanol (18o).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3441 (ν O-H); 2868 (ν C-H, N-CH); 1638 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.92 (t, 3H, J = 7.2 Hz, H₃-4''), 1.36 (m, 2H, H₂-3''), 1.55 (m, 2H, H₂-2''), 2.74 (m, 2H, H₂-1''), 2.81 (dd, 1H, J = 9.4, 12.2 Hz, H-1b), 3.01 (dd, 1H, J = 3.4, 12.2 Hz, H-1a), 4.83 (dd, 1H, J = 3.4, 9.4 Hz, H-2), 7.26 – 7.30 (m, 1H, H-4'), 7.32 – 7.38 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

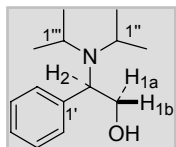
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.7 (c, C-4''), 20.1 (t, C-3''), 30.9 (t, C-2''), 48.9 (t, C-1''), 56.4 (t, C-1), 71.0 (d, C-2), 125.8 (d, 2C, C-2', C-6'), 127.7 (d, C-4'), 128.4 (d,

2C, C-3', C-5'), 142.0 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-2', C-6' → H-2; C-1'' → H-2.

MS (ESI) m/z : 194 $[M+1]^+$.

MS-MS m/z : 194, 176 (M-H₂O).

VI.1.16. (±)-2-diisopropilamino-2-feniletanol (18p).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3406 (ν O-H); 2963 (ν C-H); 2870 (ν C-H, N-CH);

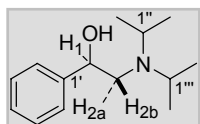
1602, 1493 (ν C=C núcleo aromático); 1395, 1363 (δ_s CH₃ isopropilo).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 6H, 2 Me), 1.15 (d, J = 6.8 Hz, 6H, 2 Me), 3.37 (septuplete, J = 6.8 Hz, 2H, H-1'', H-1'''), 3.48 (dd, J = 5.7, 10.3 Hz, 1H, H-1a), 3.78 (dd, J = 10.2, 10.3 Hz, H-1b), 4.02 (dd, J = 5.7, 10.2 Hz, 1H, H-2), 7.25-7.37 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21.7 (c, 2C, CH(CH₃)₂), 24.5 (c, 2C, CH(CH₃)₂), 45.2 (d, 2C, C-1'', C-1'''), 59.6 (d, C-2), 61.3 (t, C-1), 127.3 (d, C-4'), 128.2 (d, 2C, C-3', C-5'), 129.2 (d, 2C, C-2', C-6'), 140.8 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1' → H-2; C-1'', C-1''' → H-2.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 221 $[M+1]^+$ (4); 190 $[M-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ (99); 148 (98); 131 (40); 104 (99); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (64); 83 (100); 79 (54); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (50); 47 (36).

VI.1.17. (±)-2-diisopropilamino-1-feniletanol (19p).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3386 (ν O-H); 2967 (ν C-H); 2872 (ν C-H, N-CH);

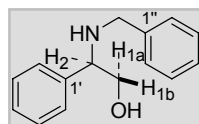
1603, 1493 (ν C=C núcleo aromático); 1394, 1366 (δ_s CH₃ isopropilo).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.04 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 2 Me), 1.14 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 2 Me), 2.38 (dd, J = 10.5, 13.5 Hz, 1H, H-2b), 2.74 (dd, J = 3.6, 13.5 Hz, H-2a), 3.16 (septuplete, J = 6.6 Hz, 2H, H-1'', H-1'''), 4.57 (dd, J = 3.6, 10.5 Hz, 1H, H-1), 7.26 (m, 1H, H-4'), 7.32-7.39 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 19.3 (c, 2C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.5 (c, 2C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 48.1 (d, 2C, C-1'', C-1'''), 53.3 (t, C-2), 69.0 (d, C-1), 125.7 (d, 2C, C-2', C-6'), 127.2 (d, C-4'), 128.3 (d, 2C, C-3', C-5'), 143.3 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-2', C-6' \rightarrow H-1; C-1'', C-1''' \rightarrow 2H-2.

MS (E.I.) m/z (intensidad relativa): 220 $[\text{M}]^+$ (2); 113 $[\text{CH}_2\text{N}^i\text{Pr}_2]^+$ (79); 105 $[\text{PhCHOH}]^+$ (24); 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (23); 83 (100); 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (46); 71 (77); 56 (43); 47 (36).

VI.1.18. (\pm)-2-bencilamino-2-feniletanol (18r).



Aceite amarillo.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3327 (ν O-H); 2867 (ν C-H, N-CH); 1492, 1453 (ν C=C núcleo aromático).

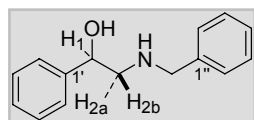
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.64 (s_a , 2H, OH, NH), 3.61 (dd, J = 8.8, 10.8 Hz, 1H, H-1b), 3.64 (d, J = 12.8 Hz, 1H, CH_{2a} -Ph), 3.72 (dd, J = 4.4, 10.8 Hz, 1H, H-1a), 3.80 (d, J = 12.8 Hz, 1H, CH_{2b} -Ph), 3.84 (dd, J = 4.4, 8.8 Hz, 1H, H-2), 7.26-7.40 (m, 10H, 2 Ph).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 51.1 (t, CH_2 -Ph), 63.7 (d, C-2), 66.7 (t, C-1), 127.0-128.6 (10C, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), 139.9 (s, C-1'), 140.3 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1'' \rightarrow 2H-4; C-1' \rightarrow 2H-1.

MS (ESI) m/z : 228 $[\text{M}+1]^+$.

MS-MS m/z : 228, 108 (NH- CH_2 -Ph), 91 (C_7H_7).

VI.1.19. (\pm)-2-bencilamino-1-feniletanol (19r).



Sólido amarillo.

Punto de fusión: 87-92.5 $^{\circ}\text{C}$.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3293 (ν O-H); 2836 (ν C-H, N-CH); 1602, 1453 (ν C=C núcleo aromático).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.45 (s_a , 2H, OH, NH), 2.78 (dd, J = 8.8, 12.2 Hz, 1H, H-2b), 2.96 (dd, J = 3.6, 12.2 Hz, 1H, H-2a), 3.87 (dd, J = 13.2, 19.6 Hz, 2H, CH_2 -Ph), 4.78 (dd, J = 3.4, 9.0 Hz, 1H, H-1), 7.26-7.35 (m, 10H, 2 Ph).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 53.5 (t, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 56.5 (t, C-2), 71.8 (d, C-1), 125.8 (d, 2C, C-2', C-6'), 127.2 (d, C-4''), 127.5 (d, C-4'), 128.1 (d, 2C, C-2'', C-6''), 128.4 (d, 2C, C-3', C-5'*), 128.5 (d, 2C, C-3'', C-5''*), 139.7 (s, C-1''), 142.2 (s, C-1'). HMBC (selección de correlaciones): C-1'' \rightarrow 2H-4; C-1' \rightarrow H-1; C-2', C-6' \rightarrow H-1; C-2'', C-6'' \rightarrow 2H-4; C-2 \rightarrow 2H-4, H-1; C-4 \rightarrow 2H-2. * Señales intercambiables.

MS (ESI) m/z : 228 $[\text{M}+1]^+$.

MS-MS m/z : 228, 210 (M-H₂O), 193.

VII. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGIESTÁTICA SOBRE *Botrytis cinerea* 2100.

La actividad fungiestática de los aminoalcoholes sintetizados en el apartado VI, sobre *B. cinerea* 2100 ha sido estudiada mediante ensayos de inhibición del crecimiento del micelio de. A continuación se detallan los porcentajes de inhibición (I) obtenidos a lo largo del bioensayo, y la concentración efectiva para reducir a un 50% el crecimiento del micelio (EC_{50}), a los 3 y 5 días.

I (%)		2-(fenilamina)-2-feniletanol (18a)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	13±6	33±6	70±0	100±0
	2º	21±6	50±12	82±1	91±0
48 h	1º	23±4	36±2	63±1	86±4
	2º	25±4	40±2	62±3	84±0
72 h	1º	20±2	32±2	58±2	78±5
	2º	21±1	39±3	58±2	57±1
96 h	1º	20±5	32 ±4	58±1	78±2
	2º	20±1	38±4	57±1	80±1
120 h	1º	34±4	36±4	66±3	79±2
	2º	32±7	38±3	57±4	77 ±2
144 h	1º	44±2	44±2	56±3	80±1
	2º	44±0	44±1	54±5	75±3

I (%)		2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (18b)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	16±9	23±15	54±9	72±3
	2°	-8±7	8±4	42±4	89±1
48 h	1°	15±5	21±4	36±5	68±3
	2°	6±6	18±2	38±3	67±2
72 h	1°	22±0	24±3	44±3	65±1
	2°	9±4	22±2	38±3	69±2
96 h	1°	36±1	37±1	40±1	67±2
	2°	11±1	21±1	34±5	68±2
120 h	1°	44±0	44±0	44±0	65±2
	2°	31±7	31±7	34±5	72±3
144 h	1°	44±0	44±0	44±0	63±2
	2°	42±1	42±1	42±1	74±1

I (%)		2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18c)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	6±14	24±3	56±5	77±7
	2°	-4±7	35±10	65±2	92±7
48 h	1°	24±7	38±3	61±2	78±4
	2°	4±4	27±4	59±2	78±2
72 h	1°	23±3	38±5	60±2	76±4
	2°	14±2	33±3	60±2	75±3
96 h	1°	36±4	45±5	66±2	76±2
	2°	15±3	36±4	60±1	73±3
120 h	1°	44±0	48±1	69±3	73±1
	2°	31±7	39±5	60±2	72±2
144 h	1°	44±0	47±0	66±2	68±3
	2°	43±1	46±1	62±4	71±1

I (%)		2-(3'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18d)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	30±0	60±0	90±0	100±0
	2º	29±6	46±3	79±1	100±0
48 h	1º	23±6	51±2	75±2	92±0
	2º	19±4	52±8	78±6	96±5
72 h	1º	35±8	59±5	76±3	89±0
	2º	33±4	57±5	80±4	95±3
96 h	1º	45±10	69±3	79±1	89±0
	2º	41±6	63±2	79±4	93±4
120 h	1º	53±5	74±1	83±1	90±2
	2º	51±4	71±2	81±3	94±2
144 h	1º	58±6	76±2	84±1	90±1
	2º	54±5	72±1	81±3	93±2

I (%)		2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18e)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	20±0	40±0	87±6	100±0
	2º	29±17	46±13	89±1	100±0
48 h	1º	20±0	47±5	79±3	92±0
	2º	27±6	57±8	84±3	91 ±1
72 h	1º	12±3	43±5	73 ±3	87±3
	2º	27±5	61±6	79±4	93±1
96 h	1º	28±7	57±3	79±1	86±1
	2º	28±7	61±4	78±4	91±1
120 h	1º	37±2	62±5	79±2	87±3
	2º	38±6	68±2	77±2	88±2
144 h	1º	44±1	66 ±6	78±3	85±4
	2º	46±1	70±4	77±3	89±1

I (%)		2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18f)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	87±6	100±0	100±0	100±0
	2°	75±5	89±1	100±0	100±0
48 h	1°	64±4	95±2	100±0	100±0
	2°	64±6	91±1	100±0	100±0
72 h	1°	65±3	88±2	96±2	100±0
	2°	66±4	89±1	100±0	100±0
96 h	1°	63±2	81±1	97±1	99±1
	2°	64±6	85±3	99±1	100±0
120 h	1°	63±3	82±1	97±1	100±1
	2°	63±9	84±3	97±1	100±0
144 h	1°	56±1	79 ±2	95±1	99±1
	2°	60±10	82±4	96±2	100±1

I (%)		2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18g)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	57±13	100±0	100±0	100±0
	2°	71±2	87 ±6	100±0	100±0
48 h	1°	40±10	88.1±20	100±0	100±0
	2°	71±4	88±2	98±2	100±0
72 h	1°	40±9	84±1	97±0	100±0
	2°	72±2	82±1	97±1	100±0
96 h	1°	38±7	79±2	94±2	100±0
	2°	73±2	81±2	97±1	100±0
120 h	1°	40±3	79±1	94±1	100±1
	2°	73±2	79±4	95±2	96±3
144 h	1°	46±1	77±1	91±5	100±3
	2°	73±4	77±5	94±4	95±2

I (%)		2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18h)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	86±7	93±6	100±0	100±0
	2º	84±5	90±1	100±0	100±0
48 h	1º	66±7	84±3	100±0	100±0
	2º	76±2	89±0	95±2	100±0
72 h	1º	64±6	80±5	94±1	95±3
	2º	75 ±3	85±3	95±1	98±1
96 h	1º	59±5	75±6	94±2	96±2
	2º	74±4	84±1	93±2	98±1
120 h	1º	55±4	72±6	93±3	94±2
	2º	74±5	83±1	93±1	97±1
144 h	1º	53±5	69±9	91±3	93±1
	2º	73±10	82±3	92±2	96±2

I (%)		4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18i)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	16±5	22±10	66±16	81±1
	2º	-8±6	27±9	73±6	89±1
48 h	1º	22±2	26±4	63±2	77±0
	2º	8±0	33±4	59±2	78±2
72 h	1º	22±1	28±6	60±2	74±0
	2º	11±4	40±5	62±2	80±3
96 h	1º	31±3	35±6	64±3	73±1
	2º	13±1	38±4	66±2	77±1
120 h	1º	34±5	37±8	68±5	76±2
	2º	31±7	44±6	69±2	78±1
144 h	1º	40±2	40±2	69±1	73±1
	2º	44±1	50±4	70±2	79±0

I (%)		2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18j)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	59±5	72±11	72±2	88±5
	2°	42±4	81±6	89±1	89±1
48 h	1°	47±2	67±2	81±4	86±2
	2°	41±5	64±4	80±1	88±1
72 h	1°	46±2	67±1	78±2	84±0
	2°	42±5	68±3	83±2	89±2
96 h	1°	48±3	68±3	80±1	84±1
	2°	37±4	65±3	82±0	86±0
120 h	1°	42±4	69±1	80±1	85±1
	2°	36±5	65±3	80±1	85±2
144 h	1°	40±2	67±1	79±1	84±2
	2°	44±1	63±2	79±1	86±1

I (%)		3-metoxycarbonil-5-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18k)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	30±17	44±0	63±6	70±6
	2°	29±5	51±11	69±2	77±7
48 h	1°	26±7	29±2	51±1	59±4
	2°	17±2	36±0	56±0	61±2
72 h	1°	21±6	32±3	56±0	60±5
	2°	22±4	38±1	60±0	63±1
96 h	1°	23 ±3	35±4	61±4	67±3
	2°	23±1	39±3	65±2	69±3
120 h	1°	25±6	35±6	64±3	70±3
	2°	36±3	41±2	68±1	72±2
144 h	1°	40±5	43±3	61±1	65±4
	2°	44±1	45±1	65±1	74±1

I (%)		4-metoxycarbonil-2-(1'-fenil-2-hidroxi-etilamino)benzoato de metilo (18l)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	67±0	70±6	70±6	78±11
	2º	54±4	74±5	77±3	80±8
48 h	1º	48±2	59±1	62±6	65±6
	2º	41±5	64±8	63±4	67±2
72 h	1º	46±2	52±3	57±5	62±3
	2º	38±7	56±8	58±1	63±3
96 h	1º	42±8	50±5	52±5	56 ±1
	2º	37±7	51±2	52±3	61±2
120 h	1º	37±4	44±5	44±3	48±3
	2º	38±5	45±2	47±1	58±3
144 h	1º	41±4	41±5	43±2	40±2
	2º	44±1	44±0	44±0	48±3

I (%)		2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (18m)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	46±13	79±10	93±12	100±0
	2º	52±3	74±5	87±5	97±6
48 h	1º	30±5	60±22	85±11	100±0
	2º	36±3	54±3	82±4	99±2
72 h	1º	28±4	39±19	74±10	93±1
	2º	33±2	47±4	68±1	96±3
96 h	1º	24±2	38±14	65±7	86±4
	2º	31±2	43±3	63±3	91±3
120 h	1º	35±6	40±5	60±6	80±3
	2º	37±4	39±3	57±6	77±6
144 h	1º	44±0	44±0	53±1	73±1
	2º	44±0	44±0	50±3	70±6

I (%)		2-(bencilfenilamino)-2-feniletanol (18n)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	50±0	57±6	70±0	77±12
	2°	46±3	54±8	54±3	68±2
48 h	1°	48±0	52±0	52±0	56±0
	2°	48±5	51±7	52±5	61±1
72 h	1°	51±4	55±2	56±4	57±3
	2°	49±2	49±2	50±3	58±3
96 h	1°	50±4	54±3	54±4	62±7
	2°	48±2	51±4	51±3	601
120 h	1°	53±2	64±4	55±4	62±5
	2°	50±1	51±3	51±4	58±4
144 h	1°	49±4	45±5	45±6	54±7
	2°	45±2	46±4	45±1	46±4

I (%)		2-butilamino-2-feniletanol (18o)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	19±10	19±10	19±10	29±8
	2°	0±11	0±0	10 ±10	21±20
48 h	1°	15±3	10±2	12±2	18 ±3
	2°	4±7	5±6	11±5	19±2
72 h	1°	19±4	17±7	15±4	21±0
	2°	11±2	10±5	18±1	21±1
96 h	1°	23±1	24±2	24±1	26±2
	2°	24±2	24±2	26±2	27±1
120 h	1°	37±4	37±4	37±4	37±4
	2°	41±2	41±2	41±2	41±2
144 h	1°	44±0	44±0	44±0	44±0
	2°	44±0	44±0	44±0	43±0

I (%)		2-diisopropilamino-2-feniletanol (18p)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	48±17	42±3	58±13	68±7
	2º	21±11	29±10	39±6	50±9
48 h	1º	30±5	35±1	48±3	60±1
	2º	9±8	21±2	32±0	49±2
72 h	1º	32±4	36±4	44±2	56±2
	2º	17±9	26±1	37±2	53±3
96 h	1º	31±3	36±3	42±4	55±2
	2º	25±2	28±1	34±2	51±4
120 h	1º	37±4	38±3	40±2	54±4
	2º	41±2	41±2	41±2	51±3
144 h	1º	44±0	44±0	44±0	47±1
	2º	44±0	44±0	44±0	46±1

I (%)		2-diisopropilamino-1-feniletanol (19p)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	7±6	25±7	7 ±12	39±28
	2º	19±18	29±15	16±5	32±4
48 h	1º	5±4	18±4	13±9	31±7
	2º	11±3	17±9	10±2	22±3
72 h	1º	12±6	14±4	18±5	33±5
	2º	12±4	17±5	14±0	23±4
96 h	1º	16±1	18±1	19±1	33±1
	2º	25±1	23±1	24±2	26±2
120 h	1º	35±6	35±6	35±6	35±5
	2º	37±4	37±4	37±4	37±4
144 h	1º	44±0	44±0	44±0	44±0
	2º	44±0	44±0	44±0	44±0

I (%)		2-bencilamino-2-feniletanol (18r)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	0±0	0±0	0±0	0±0
	2°	0±15	18±8	21±12	27±8
48 h	1°	0±0	0±0	0±0	0±0
	2°	17±6	18±4	25±4	29±0
72 h	1°	0±0	0±0	0±0	0±0
	2°	7±6	8±3	12±2	22±4
96 h	1°	5±1	5±1	5±1	8±1
	2°	18±0	18±0	21±1	27±0
120 h	1°	-	-	-	-
	2°	35±5	35±5	35±5	37±3
144 h	1°	-	-	-	-
	2°	-	-	-	-

I (%)		2-bencilamino-1-feniletanol (19r)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	12±4	12±4	27±16	38±3
	2°	12±6	12±10	29±4	44±9
48 h	1°	23±6	24±8	27±5	42±5
	2°	7±2	8±0	21±1	34±2
72 h	1°	13±6	18±6	25±7	49±1
	2°	2±2	9±1	17±6	36±1
96 h	1°	24±1	24±2	28±1	50±0
	2°	15±0	15±0	22±3	40±1
120 h	1°	40±2	40±2	41±2	55±2
	2°	32±6	32±6	32±6	42±4
144 h	1°	44±0	44±0	44±0	56±1
	2°	43±0	43±0	43±0	47±3

<i>Botrytis cinerea</i> 2100											
EC ₅₀		18a	18b	18c	18d	18e	18f	18g	18h	18i	
72 h	1º	66±4	137±3	73±6	39±8	64±4	7±2	1±0	9±4	82±5	
	2º	74±4	140±5	83±3	41±6	44±1	7±2	5±1	3±1	75±88	
120 h	1º	36±2	-	24±3	15±4	34±5	12±2	4±1	20±3	56±12	
	2º	35±4	-	35±6	20±4	31±4	11±6	4±1	3±2	52±11	
EC ₅₀		18j	18k	18l	18m	18n	18o	18p	19p	18r	19r
72 h	1º	25±2	105±9	40±13	55±8	13±6	-	152±18	364±60	-	209±9
	2º	28±5	40±2	51±11	50±3	76±51	-	192±14	358±12 6	-	270±17
120 h	1º	28±4	68±9	120±38	38±5	26±11	-	-	-	-	-
	2º	34±5	29±1	106±25	39±3	27±3	-	-	-	-	-

VIII. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGIESTÁTICA SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* 20122.

La actividad fungiestática de los aminoalcoholes sintetizados en el apartado VI sobre *C. gloeosporioides* 20122 ha sido estudiada mediante ensayos de inhibición del crecimiento del micelio. A continuación se detallan los porcentajes de inhibición (I) obtenidos a lo largo del bioensayo, y la concentración efectiva para reducir a un 50% el crecimiento del micelio (EC_{50}), a los 3 y 5 días.

I (%)		2-(fenilamina)-2-feniletanol (18a)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	-27±33	18±41	36±4	55±27
	2º	-29±25	-35±22	24±9	47±6
48 h	1º	17±7	26±2	47±8	59±3
	2º	-13±0	-7±0	22±4	40±0
72 h	1º	16±8	30±1	42±7	58±5
	2º	-13±2	3±6	26±2	45±2
96 h	1º	20±8	32±1	46±2	58±3
	2º	1±1	9±5	29±1	47±2
120 h	1º	32±4	37±3	46±4	60±2
	2º	15±8	20±5	35±2	49±2
144 h	1º	43±2	45±1	47±1	54±3
	2º	40±8	40±8	43±4	51±2

I (%)		2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (18b)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	38±0	38±0	38±0	50±13
	2º	13±0	25±13	17±7	46±7
48 h	1º	28±3	33±3	39±4	51±3
	2º	23±3	29±3	32±5	46±3
72 h	1º	28±1	33±2	39±3	50±1
	2º	27±2	33±2	34±1	46±1
96 h	1º	31±1	36±2	41±1	50±1
	2º	23±1	31±1	36±2	46±4
120 h	1º	36±4	38±3	43±1	51±1
	2º	32±5	35±4	37±2	45±1
144 h	1º	42±1	42±1	45±1	50±1
	2º	42±1	42±1	42±1	45±0

I (%)		2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18c)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	309±10	50±17	78±10	100±0
	2º	13±00	25±0	58±7	88±0
48 h	1º	30±2	45±3	64±4	88±4
	2º	22±0	33±3	58±3	83±0
72 h	1º	25±2	38±3	59±2	84±0
	2º	26±2	34±1	56±3	83±1
96 h	1º	27±2	39±3	61±2	82±1
	2º	28±2	36±2	56±2	80±1
120 h	1º	29±4	38±2	55±1	80±2
	2º	35±4	39±2	55±2	81±2
144 h	1º	37±4	439±09	57±2	78±3
	2º	42±1	42±19	54±3	79±1

I (%)		2-(3'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18d)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	44±10	70±10	89±10	100±0
	2°	33±19	63±0	88±0	100±0
48 h	1°	32±5	57±7	82±3	96±3
	2°	33±7	57±0	77±3	96±0
72 h	1°	27±5	52±3	74±3	94±0
	2°	33±7	56±1	78±3	94±2
96 h	1°	28±3	48±2	72±1	89±2
	2°	34±3	55±1	76±3	90±0
120 h	1°	30±3	48±1	70±1	87±1
	2°	37±3	53±2	74±4	85±3
144 h	1°	37±4	48±2	70±3	86±3
	2°	42±1	51±3	72±5	81±3

I (%)		2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (18e)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	33±17	67±0	94±10	100±0
	2°	25. ±0	50±0	75±0	100±0
48 h	1°	38±1	55±9	68±1	95±0
	2°	33±3	49±3	70±0	93±3
72 h	1°	30±2	47±2	69±2	89±2
	2°	35±1	52±2	72±2	92±0
96 h	1°	32±4	49±3	67±1	87±0
	2°	36±2	53±1	72±2	89±1
120 h	1°	32±3	48±1	65±1	84±1
	2°	40±1	52±0	69±2	87±2
144 h	1°	37±4	47±1	65±3	83±2
	2°	43±1	52±2	67±2	85±2

I (%)		2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18f)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	94±0	100±0	100±0	100±0
	2º	75±10	75±0	100±0	100±0
48 h	1º	71 ±3	88±0	100±0	100±0
	2º	73±3	87±3	100±0	100±0
72 h	1º	64±2	80±3	100±3	100±0
	2º	69±3	86±0	97±0	100±0
96 h	1º	62±2	76±1	98±1	100±0
	2º	67±3	83±1	97±0	100±0
120 h	1º	59±3	74±3	95±1	100±0
	2º	65±3	79±2	96±2	100±0
144 h	1º	59±3	72±3	93±3	100±0
	2º	62. ±1	76±1	94±2	100±2

I (%)		2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18g)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	83±0	100±0	100±0	100±0
	2º	75±0	88±0	100±0	100±0
48 h	1º	59±2	79±5	100±0	100±0
	2º	68±5	87±0	100±0	100±0
72 h	1º	54±2	75±2	91±2	100±0
	2º	65±2	82±1	99±2	100±0
96 h	1º	54±2	71±1	89±0	100±0
	2º	65±3	80±1	98±0	100±0
120 h	1º	54±1	69±1	86±0	98±1
	2º	63±2	78±1	96±2	100±0
144 h	1º	55±2	69±2	86±2	97±1
	2º	61±3	74±2	94±2	100±1

I (%)		2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (18h)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	610±10	78±10	100±0	100±0
	2°	71±70	83±7	100±0	100±0
48 h	1°	46±2	73±1	100±0	100±0
	2°	57±0	78±0	100±0	100±0
72 h	1°	47±2	64±3	92±2	100±0
	2°	55±2	73±0	96±2	100±0
96 h	1°	45±2	63±3	87±1	98±4
	2°	55±2	71±1	94±2	99±1
120 h	1°	45±2	61±4	86±1	95±3
	2°	54±3	69±2	91±4	98±2
144 h	1°	45±1	59±2	83±1	92±2
	2°	52±3	66±4	88±4	97±3

I (%)		4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18i)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	25±0	38±0	58±7	75±0
	2°	17±7	29±7	46±7	58±7
48 h	1°	33±3	41±3	64±3	81±5
	2°	22±0	28±7	44±4	61±0
72 h	1°	30±2	38±1	59±5	76±2
	2°	24±1	30±3	45±5	58±1
96 h	1°	34±2	38 ±2	57±2	72±4
	2°	24±2	32±3	42±4	58±1
120 h	1°	38±3	42±1	54±3	69±4
	2°	32±5	36±3	41±1	54±1
144 h	1°	44±1	44±1	46±4	58±6
	2°	44±1	44±1	44±0	48±2

I (%)		2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18j)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	38±0	54±7	88±0	100±0
	2º	38±0	46±7	75±0	100±0
48 h	1º	41±5	59±5	86±3	91±4
	2º	33±3	51±5	73±3	94±3
72 h	1º	41±4	59±2	82±1	90±4
	2º	34±3	49 ±3	71±2	90±2
96 h	1º	41±1	60±2	80±1	89±3
	2º	38±2	49±3	68±3	88±3
120 h	1º	45±1	57±1	76±3	86±4
	2º	37±3	49±1	66±5	84±5
144 h	1º	44±0	50±2	68±2	78±2
	2º	44±1	44±0	54±5	73±5

I (%)		3-metoxicarbonil-5-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (18k)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	31±5	42±4	77±2	85±6
	2º	31±5	31±5	58±9	77±2
48 h	1º	28±3	46±3	71±3	78±9
	2º	26±0	41±3	64±3	75 ±3
72 h	1º	28±1	46±3	70±2	75±5
	2º	25±0	41±1	64±1	71±1
96 h	1º	32±1	46±1	68±1	69±7
	2º	29±0	42±1	63±3	67±1
120 h	1º	35±3	47±2	66±3	65±6
	2º	31±6	43±2	60±3	64±3
144 h	1º	44±2	46±1	56±4	55±8
	2º	44±2	44±1	53±3	53±3

I (%)		4-metoxycarbonil-2-(1'-fenil-2-hidroxi-etilamino)benzoato de metilo (18l)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	39±11	42±4	42±4	42±4
	2°	42±4	42±4	42±4	42±4
48 h	1°	39±0	41±3	41±3	49±3
	2°	41±3	41±3	41±3	48±0
72 h	1°	36±2	41±1	41±4	50±1
	2°	36±3	39±4	38±1	44±1
96 h	1°	38±1	42±2	42±1	48±3
	2°	37±2	37±0	37±0	43±0
120 h	1°	39±1	40±1	41±3	46±1
	2°	38±1	38±2	39±1	42±1
144 h	1°	44±2	44±2	44±2	46±0
	2°	44±2	44±2	44±2	44±0

I (%)		2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (18m)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	4±7	38±0	54±7	100±0
	2°	8±7	13±0	38±0	63±13
48 h	1°	26±0	42±3	59±5	81±3
	2°	16±3	25±3	41±3	61±4
72 h	1°	25±0	41±2	58±1	79±2
	2°	18±1	28±3	43±1	62±3
96 h	1°	28±2	40±1	57±2	76±1
	2°	21±1	28±1	40±1	62±3
120 h	1°	32±5	42±0	56±3	73±2
	2°	32±5	34±5	42±1	60±4
144 h	1°	42±1	44±0	53±3	70±2
	2°	42±1	42±1	42±1	57±0

I (%)		2-(bencilfenilamino)-2-feniletanol (18n)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	63±0	71±7	75±0	88±0
	2º	58±7	63±0	58±7	67±7
48 h	1º	67±3	71±3	71±3	74±0
	2º	61±0	59±3	64±3	65±0
72 h	1º	63±1	67±3	67±2	68±1
	2º	56±1	57±2	60±1	65±3
96 h	1º	61±1	65±1	65±2	66±1
	2º	57±1	58±1	61±1	61±2
120 h	1º	58±2	63±2	63±1	65±2
	2º	55±3	57±3	58±2	61±3
144 h	1º	55±2	60±4	61±3	62±3
	2º	52±2	55±2	56±1	57±3

I (%)		2-butilamino-2-feniletanol (18o)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	20±17	20±17	20±4	33±16
	2º	39±32	54±26	46±26	54±18
48 h	1º	23±14	17±9	8±3	17±6
	2º	34±12	13±18	24±7	24±8
72 h	1º	11±5	10±5	8±4	16±3
	2º	35±6	13±2	27±5	31±2
96 h	1º	24±1	16±1	18±3	21±0
	2º	37±1	11±3	26±3	21±1
120 h	1º	26±8	26±8	26±8	28±7
	2º	12±7	19±6	24±2	27±1
144 h	1º	43±3	43±3	43±3	43±3
	2º	43±10	43±10	43±10	43±10

I (%)		2-diisopropilamino-2-feniletanol (18p)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	7±29	27±41	27±21	40±26
	2°	46±18	46±18	62±13	69±16
48 h	1°	10±9	4±9	21±8	35±4
	2°	24±7	0±8	16±1	55±6
72 h	1°	11±4	13±3	18±2	21±2
	2°	33±2	5±2	21±2	49±2
96 h	1°	21±1	26±2	24±1	30±0
	2°	33±2	11±0	18±1	57±2
120 h	1°	31±5	31±5	32±5	35±3
	2°	32±4	19±3	27±2	46±7
144 h	1°	43±3	43±3	43±3	43±3
	2°	43±10	43±10	43±10	43±6

I (%)		2-diisopropilamino-1-feniletanol (19p)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1°	27±25	27±25	33±30	40±8
	2°	15±23	31±27	39±13	69±16
48 h	1°	21±12	25±11	27±7	33±6
	2°	8±8	21±4	26±8	32±7
72 h	1°	13±3	17±3	21±2	25±3
	2°	17±2	39±2	41±2	43±2
96 h	1°	19±1	21±1	25±1	26±1
	2°	14±0	38±2	42±1	45±3
120 h	1°	29±6	30±6	32±5	34±3
	2°	21±2	45±9	47±9	49±10
144 h	1°	43±3	43±3	43±3	43±3
	2°	43±10	43±6	43±5	43±6

I (%)		2-bencilamino-2-feniletanol (18r)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	-9±19	9±60	-36±39	-18±44
	2º	-65±4	-59±17	-59±8	-53±24
48 h	1º	5±9	16±13	5±5	14±6
	2º	-38±10	-31±4	-29±4	-27±7
72 h	1º	7±6	12±10	9±3	15±4
	2º	-28±4	-21±4	-26±4	-21±2
96 h	1º	12±4	14±4	13±3	23±4
	2º	-7±4	-7±2	-2±3	-3±0
120 h	1º	28±6	28±6	28±6	31±4
	2º	15±8	15±8	15±8	15±8
144 h	1º	43±2	43±2	43±2	43±2
	2º	40±8	40±8	40±8	40±8

I (%)		2-bencilamino-1-feniletanol (19r)			
		25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
24 h	1º	-36±62	-9±45	0±42	0±54
	2º	-29±12	-24±21	-12±11	-6±12
48 h	1º	5±9	7±3	12±3	3±8
	2º	-7±7	-7±7	-2±4	-4±4
72 h	1º	4±7	8±5	11±3	11±6
	2º	-15±4	-12±7	0±7	-12±4
96 h	1º	12±5	13±3	13±6	15±5
	2º	-5±3	1±2	3±3	3±3
120 h	1º	28±6	28±6	29±5	29±5
	2º	15±8	15±8	16±8	20±5
144 h	1º	43±2	43±2	43±2	43±2
	2º	40±8	40±8	40±8	40±8

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 20122											
EC ₅₀		18a	18b	18c	18d	18e	18f	18g	18h	18i	
72 h	1º	-	197±40	67±4	49±2	52±2	10±2	18±1	27±2	68±4	
	2º	-	242±14	94±4	43±5	44±2	6±1	9±2	19±2	69±5	
120 h	1º	-	187±15	86±6	49±3	51±2	15±3	20±1	31±2	69±4	
	2º	-	163±26	82±8	41±2	41±1	10±3	12±2	21±2	83±4	
EC ₅₀		18j	18k	18l	18m	18n	18o	18p	19p	18r	19r
72 h	1º	34±2	58±1	211±21	69±2	1±0	-	-	-	-	-
	2º	48±3	70±1	363±66	127±10	6±3	-	-	-	-	-
120 h	1º	33±1	56±2	302±26	36±3	5±0	-	-	-	-	-
	2º	48±2	73±3	560±84	67±7	8±8	-	-	-	-	-

IX. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES.

La actividad antioxidante del producto natural (-)-gloeosporiol ((-)-I), ha sido estudiada mediante el ensayo DPPH, siguiendo la metodología descrita por Brands-Williams *et al* (apartado I.6).¹⁰

La recta de calibrado que nos permite conocer la concentración real de radical DPPH en todo momento, en función de la absorbancia de la disolución a 515 nm es la que se presenta en la *figura IX.1*.

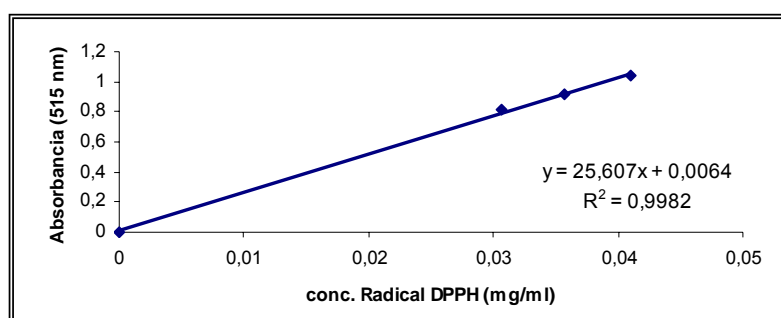


Figura IX.1. Calibración de la concentración del radical DPPH.

A continuación, se presentan los porcentajes de inhibición del radical DPPH para las tres concentraciones evaluadas, y los correspondientes porcentajes de radical DPPH remanente (calculados como $100-I$, tal y como se indicó en el apartado I.6), con el objeto de representar gráficamente la cinética de la reacción, y así determinar las condiciones para alcanzar el estado estacionario (*figura IX.2*).

Tiempo (min.)	20 μ M		15 μ M		10 μ M	
	I (%)	DPPH rem. (%)	I (%)	DPPH rem. (%)	I (%)	DPPH rem. (%)
0	0	100	0	100	0	100
5	23.73	76,27	36,43	63,57	19,92	80,08
10	54.24	45,76	40,26	59,74	24,47	75,53
20	65.19	34,81	47,16	52,84	29,93	70,07
30	72.60	27,40	52,99	47,01	34,18	65,82
40	78.00	22,00	57,55	42,45	36,91	63,09
50	80.60	17,00	60,42	39,58	38,70	61,30
60	87.96	12,04	64,23	35,77	41,24	58,76
70	89.00	11,00	65,88	34,12	43.00	57,00
80	90.88	9,12	68,97	31,03	43,98	56,02
90	91.08	8,92	70,25	29,75	45.00	55,00
100	92.02	7,98	72,15	27,85	46,48	53,52
110	92.00	8.00	72,88	27,12	47,02	52,98
120	92.00	8.00	74,71	25,29	47,87	52,13

La representación gráfica del porcentaje de radical DPPH remanente en el estado estacionario frente a la relación molar de (-)-gloeosporiol ((-)-I) y radical DPPH (*figura IX.3*), nos permite determinar el valor de EC_{50} , el poder antirradicalario (ARP), el valor estequiométrico de la reacción y el número de moles de radical DPPH reducido por cada mol de (-)-gloeosporiol (*apartado I.6*).

EC_{50} (μ M)	ARP (1/ EC_{50})	Valor estequiométrico (2xARP)	Nº de moles de DPPH [•] reducido (1/2 EC_{50})
0.14	7.02	0.28	3.51

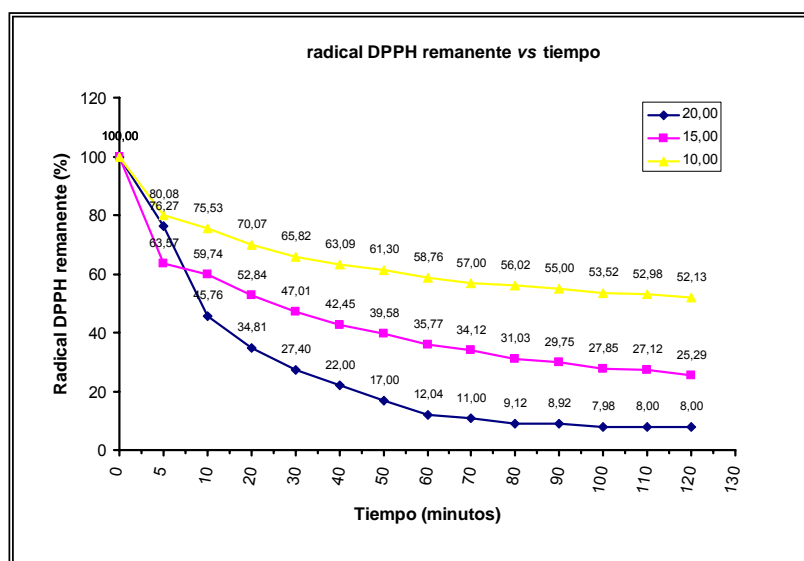


Figura IX.2. Comportamiento cinético de (-)-gloeosporiol.

A partir de la gráfica mostrada en la figura IX.3, se determinan todos los valores necesarios para establecer la actividad antioxidante de (-)-gloeosporiol.

DPPH [•] (120', %)	(-)-I/ DPPH [•]
100	0
52.13	0.14
25.29	0.21
8.00	0.26

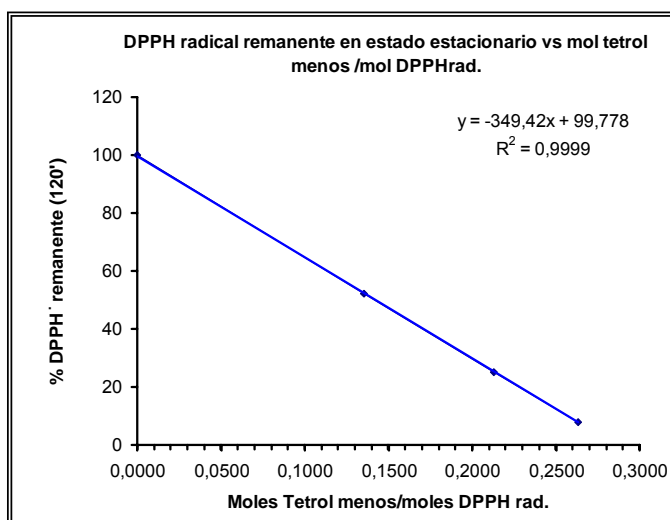


Figura IX.3. Desaparición de radical DPPH en función de la relación molar entre (-)-gloeosporiol y DPPH[•].

Conclusiones

1. Se ha iniciado el estudio de los metabolitos secundarios del hongo *Colletotrichum acutatum* 364856, que ha dado lugar al aislamiento de los siguientes compuestos: (-)-isosclerona (**IX**), tirosol (**X**), alcohol 4-hidroxibencílico (**XI**) y (+)-3-hidroxiisosclerona (**XII**).
2. El examen de los metabolitos secundarios del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* 20122 ha permitido aislar, e identificar, mediante acetilación, el compuesto (-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((-)-**Ia**). Además, una síntesis estereoselectiva de (±)-(2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano ((±)-**Ia**) ha permitido confirmar la constitución y estereoquímica relativa del producto natural aislado.
3. La síntesis anteriormente mencionada ha permitido preparar (±)-(2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-dihidroxifenil)tetrahydrofurano-3,4-diol ((±)-**I**), tetrol

precursor del producto natural aislado, al que le ha sido dado el nombre de gloeosporiol.

4. La resolución química de precursores sintéticos de (\pm)-**1a** ha permitido preparar (-)-**1a**, que presenta el mismo signo y magnitud de rotación óptica que el producto natural aislado.

5. Se ha llevado a cabo la resolución cinética mediante lipasas de (\pm)-1-[3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilanilo)fenil]prop-2-en-1-ol (**10**), que ha permitido obtener el enantiómero (+)-*R* con un exceso enantiomérico del 99%. Empleando este alcohol (+)-*R* como material de partida, con un 80% ee, se ha sintetizado enantioselectivamente (-)-gloeosporiol con un 79% ee. Esta síntesis ha permitido asignar la estereoquímica absoluta de (-)-gloeosporiol como (2*S*,3*S*,4*R*).

6. Dentro de un programa de búsqueda de nuevos modelos de fungicidas para el control de la antracnosis y de la podredumbre gris, se ha estudiado la síntesis de β -aminoalcoholes mediante la apertura nucleofílica de epóxidos por aminas, catalizada por triflato de estaño (II).

7. Como parte de este estudio, se han sintetizado 19 aminoalcoholes. De todos estos, los compuestos 4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18i**), 2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18j**), 3-metoxicarbonil-5-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18k**) y 4-metoxicarbonil-2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18l**), han sido descritos por primera vez en este estudio.

8. Como consecuencia de este estudio, se puede establecer que el $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ cataliza eficientemente la apertura regioselectiva de óxido de estireno mediante aminas aromáticas. La apertura de óxido de estireno con aminas alifáticas, catalizada por $\text{Sn}(\text{OTf})_2$, muestra un comportamiento más complejo.

9. La actividad fungistática de los compuestos **18a-18o**, **18q**, **19o** y **19q** ha sido evaluada frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* 2100 y *Colletotrichum gloeosporioides* 20122. Como consecuencia de este estudio, se han identificado una serie de compuestos que presentan EC_{50} a 5 días menores o iguales a 40 ppm: los compuestos **18a**, **18c-18h**, **18j**, **18m** y **18n** frente a *Botrytis cinerea* 2100, y **18f**, **18g**, **18h** y **18n** frente a *Colletotrichum gloeosporioides* 20122.

10. Se ha estudiado la actividad antioxidante de (-)-gloeosporiol ((-)-I) mediante el ensayo de actividad atrapadora del radical libre DPPH. Como consecuencia de este estudio, se ha observado que (-)-gloeosporiol ((-)-I) presenta una actividad atrapadora de radicales libres comparable a la del ácido protocatequico.

Los productos fitosanitarios son medios imprescindibles para la producción agrícola, tanto bajo los sistemas convencionales de agricultura, como bajo otros sistemas de agricultura, como la integrada o la ecológica, pues los estragos potenciales de las diferentes clases de plagas, determinarían la inviabilidad de muchos cultivos en las zonas de producción de mayor interés económico y social e incluso la posibilidad de mantener almacenadas las cosechas.¹

Sin embargo, la utilización de productos fitosanitarios puede tener otros efectos no deseables, y es imprescindible que estos efectos no sean en ningún modo peligrosos para la salud humana, ni tampoco que lleguen a presentar niveles de riesgo inaceptables para el medio ambiente, incluidas la flora y la fauna silvestres.¹

¹ Registro de Productos Fitosanitarios—Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación **2007**
www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/fitos.asp.

En consecuencia el Estado aplica los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas, pero que no comporten otros riesgos colaterales. Para que un producto pueda comercializarse debe estar autorizado previamente e inscrito necesariamente en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios.¹

Así, para el control de las enfermedades producidas por *Botrytis* y *Colletotrichum*, en España sólo se permite el uso de los siguientes principios activos, sobre determinados cultivos: Folpet, Tiram, Mancozeb, Maneb, Ziram, Captan, Clortalonil, Dodina, Tolifluanida, Iprodiona, Procimidona, Vinclozolina, Carbendazima, Dietofencarb, Metilo tiofanato, Pirimetanil, Mepanipirim, Miclobutanil.¹

Tiram (apartado II.1.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
THISAN 50 SEMILLAS, TISAR SEMILLAS, ROYALFLO, CORSARIO (Tiram 50% () [FS] P/V)	Bulbos de florales, bulbos de hortícolas, simiente de florales, simiente de guisantes, simiente de hortícolas, simiente de judías	Botrytis

DP: polvo para espolvoreo; WP: polvo mojable; SC: suspensión concentrada; WG: granulado dispersable en agua; EC: concentrado emulsionable; FS: suspensión concentrada para tratamiento de semillas.

Ziram (apartado II.1.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
BELPRON-90, OROZAM, ZIREX-PM, KEYRAM, ZIRALUQ-90, LAIRAM-90 TROPICAL, ZIRAM 90 PM, ZIRAM 90 PM CAG, TRISCABOL, CEKUZIRAM 90 PM, ZIMUR, FITOZIR 90 PM, NUTZIRAM 90 WP, TOPACIO 90 PM (Ziram 90% [WP] P/P)	Arbustos ornamentales, nogal	Antracnosis

Mancozeb (apartado II.1.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
RIOZEB COBRE, CUPERTINE M, CUPRODITHIANE, CUPRITAL M, CUPERMAN, GUCOR 20-8 (Mancozeb 8% + Sulfato cuprocálcico 20% (exp.. en Cu) [WP] P/P)	Cucurbitáceas, guisantes verdes, judías para grano, judías verdes, patata, solanáceas, vid.	Antracnosis

Maneb (apartado II.1.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
MANZATE, HORTISAN-M, AGROMANEB, MABEN, NEBE, NEBEX, INAMAN, MANEB 80-LUQSA, MINOSINA, CROSMANEB, DITHANE M 22, TRIMANGOL, MANEB ARAGONESAS, TRIMANGOL D-80, MANEB 80 VALLES (Maneb 80% [WP] P/P) MANEOR, TRIMANGOL FLOWABLE, HORTISAN M 40 (Maneb 40% [SC] P/P)	Cucurbitáceas, fresales, guisantes verdes, judías para grano, judías verdes, solanáceas	Antracnosis

Captan (apartado II.1.2)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
ORTHOCIDE 10 DUST, BENCAPTAN 10, BELPRON C-10 (Captan 10% [DP] P/P)	Hortícolas, leguminosas de grano	Antracnosis
KARNAK-85, POMODORIN 85, KPTAN 85, AGROCAPT 85 PM, CAPTAN MASSO 85, CAPTAN 85 VALLES (Captan 85% [WP] P/P)	Berenjena, endibia, escarola, fresales, garbanzo, guisantes para grano, guisantes verdes, habas para grano, habas verdes, judías verdes, lechuga, puerro, tomate	Botrytis Antracnosis
	Frutales de hueso, frutales de pepita, patata	Antracnosis
	Arbustos ornamentales, ornamentales herbáceas, vid	Botrytis
ONDAR WG (Captan 50% [WG] P/P)	Berenjena, endibia, escarola, fresales, garbanzo, guisantes verdes, habas verdes, judías verdes, lechuga, puerro, tomate	Botrytis Antracnosis
	Frutales de hueso, frutales de pepita, patata	Antracnosis
	Arbustos ornamentales, ornamentales herbáceas, vid	Botrytis

Folpet (apartado II.1.2)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
ZINE-TEC 80 FOLP, TEMPO PLUS, ORTHOPHALTAN 80 W (Folpet 80% [WP] P/P)	Berenjena, endibia, escarola, fresales, garbanzo, guisantes verdes, habas verdes, judías verdes, lechuga, puerro, tomate	Botrytis Antracnosis
	Patata, rosal	Antracnosis
	Arbustos ornamentales, ornamentales herbáceas, vid	Botrytis
FOLPET 50 FAE, FOLPLAN, FOLSYSTEM, BELPRON F-50, FOLPERAN, FOLPAN 50 W.P., FOLAFAN, FOLTAN 50, FOLPET 50 PM CAG, TEMPO, CHELAI, FOLPEC 50, MORPET (Folpet 50% [WP] P/P)	Berenjena, garbanzo, guisantes para grano, judías verdes, puerro, tomate	Botrytis Antracnosis
	Endibia, escarola, habas para grano, lechuga, patata, rosal	Antracnosis
	Arbustos ornamentales, fresales, ornamentales herbáceas, vid	Botrytis

Clortalonil (apartado II.1.4)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
DACONIL-E, RUMBLE (Clortalonil 5% [DP] P/P) PUGIL PM, RUMBLE-75M, VISCLOR 75 PM, BANCO 75 WP, CLORTAQUIM (Clortalonil 75% [WP] P/P) BRAVO 720 SC (Clortalonil 72% [SC] P/P)	Arándano, arbustos ornamentales, frambueso, fresales, grosellero, ornamentales herbáceas, solanáceas	Botrytis Antracnosis
	Cucurbitáceas de piel no comestible, pepinillo, pepino	Antracnosis
	Ajos, apio, cebolla, chalote, judías para grano, puerro	Botrytis

Dodina (apartado II.1.7)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
MELPREX 65 PM, SILLYT 65 WP, EFUZIN 65 WP (Dodina 65% [WP] P/P)	Frutales de hueso, frutales de pepita, rosal	Antracnosis

Tolilfluánida (apartado II.1.7)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
EUPAREN M WG, EUPAREN M 50 PM (Tolilfluánida 50% [WG] P/P)	Berenjena, calabacín, fresa, lechuga, melón, ornamentales herbáceas, ornamentales leñosas, pepino, pimiento, tomate, vid.	Botrytis

Iprodiona (apartado II.2.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
ROVRAL WP, CHIPCO WP (Iprodiona 50% [WP] P/P)	Ajos, arbustos ornamentales, berenjena, cebolla, cebolleta, chalote, coles de Bruselas, coles de china, cucurbitáceas de piel comestible, endibia, frambueso, fresa, grosellero, guisantes verdes, hierbas aromáticas, judías para grano, judías verdes, lechuga, melón, mirtilo, pimiento, rábano, remolacha de mesa, repollo, ruibarbo, tomate, vid, zanahoria	Botrytis

Procimidona (apartado II.2.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
NILIREX, ABSOLUTE, DRIZA, PROMIDONE 50 PM, PREMIER, ARCO, PROCIMIDONA 50 WP AGRODAN, PROZIDON 50, JUPITER 50, MIDONA, CIDONEX 50 PM, KILLER (Procimidona 50% [WP] P/P)	Ajos, arbustos ornamentales, cebolla, chalote, cucurbitáceas, endibia, escarola, frambueso, fresa, guisantes verdes, judías verdes, kiwi, lechuga, ornamentales herbáceas, solanáceas, vid	Botrytis

Vinclozolina (apartado II.2.1)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
RONILAN FL, RONILAN DF (Vinclozolina 50% [WG] P/P)	Ajos, arbustos ornamentales, cebolla, fresa, judías para grano, judías verdes, kiwi, lechuga, ornamentales herbáceas, vid de vinificación	Botrytis

Carbendazima (apartado II.2.2)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
BAVISFOR 50, NOCIOLEX, CARBENLUQ-50, CARBAZIM WP, BENDAZIM, CARBENDAZIMA 50 PM CAG, ALCODAZIM-50 PM, QUIMUZIN, EUROZIM 50 PM, CARBENDAZOL 50 PM, LAICAR, NUTDAZIMA 50, NUTDAZIM 50 WP, REANE 50, CIMA 50, BENGU 50 PM, AGONAL 50 WP, CARBENDAZIMA AGRO 50 WP, FUNGICIDA FERTIPLAN WP (Carbendazima 50% [WP] P/P)	Ornamentales herbáceas	Botrytis Antracnosis
	Arbustos ornamentales, judías para grano	Antracnosis
	Apio, pepino, tomate, vid	Botrytis
SIPCAZIM-LS, BROCCIN-50 FLOW, ALCODAZIM 50 SC, QUIMUZIN 50 FLOW, CARBENDAZIM 50 AGROMETODOS, MAYPON FLOW, CRAIN FLOW, CARBENDER 50, BENGU 50 FLOW, CIMA 50 FLOW, CARBENFAE 50, CARBAX 50, IKEBANA FUNGICIDA SISTÉMICO, GARUA, CEKUDAZIM 50 SC, CARBENDAZIMA 50 LA CAG, EUROZIM 50 SC (Carbendazima 50% [SC] P/P)	Ornamentales herbáceas	Botrytis Antracnosis
	Arbustos ornamentales, leguminosas de grano,	Antracnosis
	Pepino, tomate, vid	Botrytis

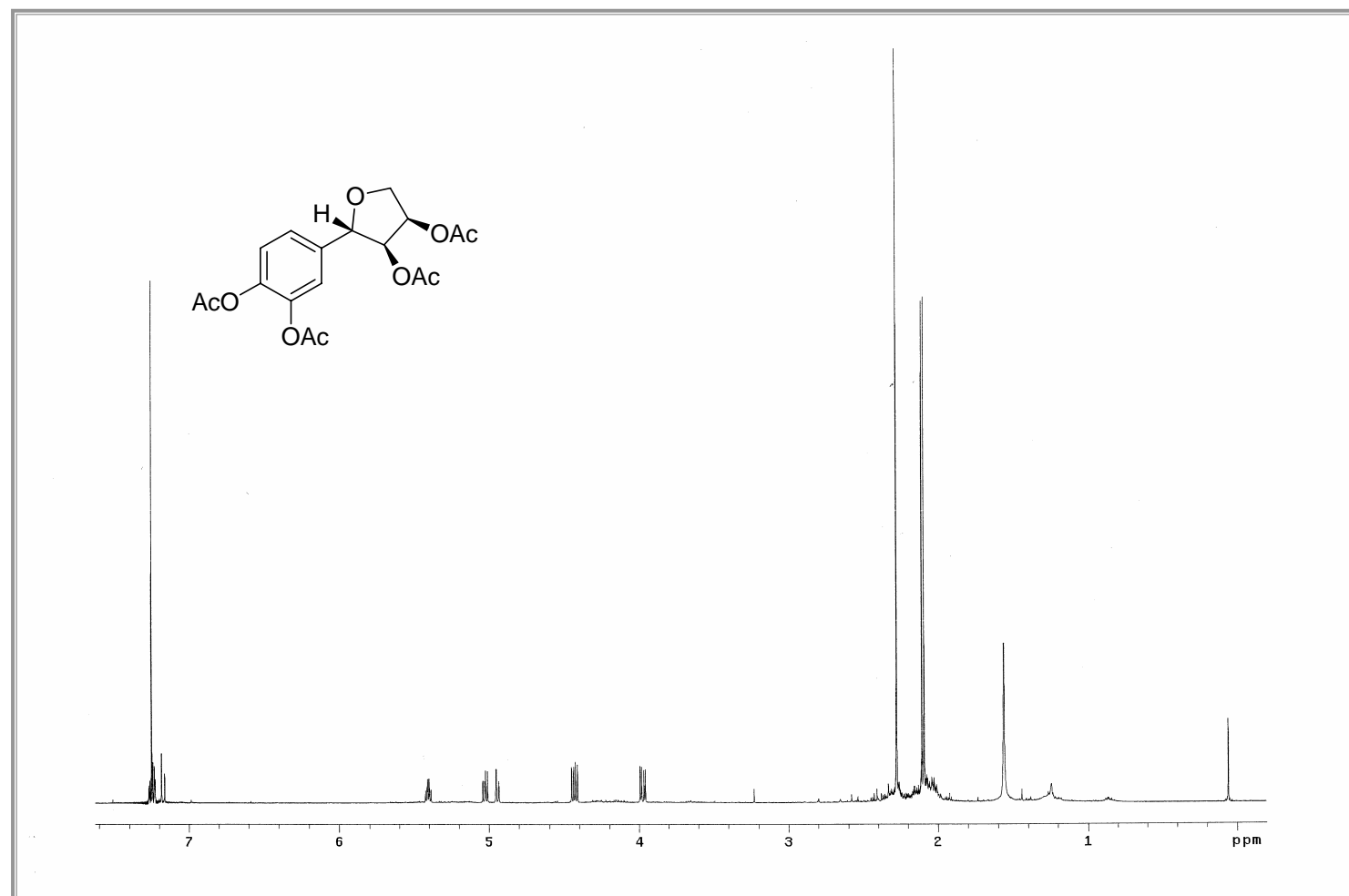
Dietofencarb (apartado II.2.2)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
SUMILAN 25 WP, POWMYL (Dietofencarb 25% [WP] P/P)	Berenjena, calabacín, pepino, tomate, vid	Botrytis

Metil tiofanato (apartado II.2.2)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
ENOVIT METIL (Metil tiofanato 70% [WP] P/P)	Arbustos ornamentales, calabacín, calabaza, melón, pepino, tomate	Botrytis Antracnosis
	Judías para grano, nogal	Antracnosis
	Apio, avellano, berenjena, lechuga, vid	Botrytis

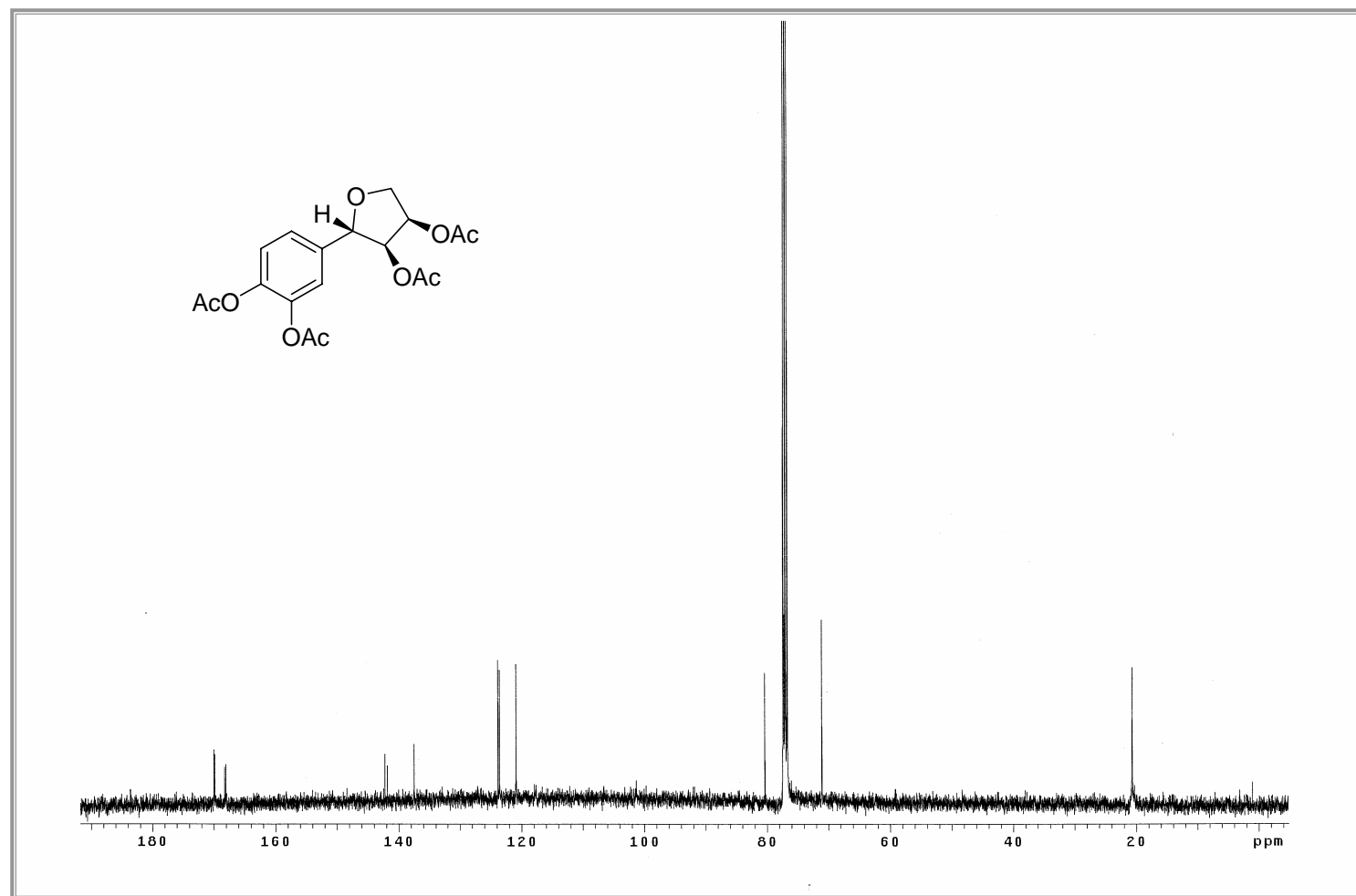
Pirimetanil (apartado II.2.3)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
SCALA (Pirimetanil 40% [SC] P/V)	Fresales, tomate, vid, berenjena, judías verdes, lechuga, pepino, pimiento	Botrytis
ADARIM 40 SC, PYRUS 400 SC (Pirimetanil 40% [SC] P/V)	Fresales, tomate, vid	Botrytis

Mepanipirim (apartado II.2.3)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
JAPICA (Mepanipirim 50% [WP] P/P)	Fresales, vid	Botrytis
FRUPICA (Mepanipirim 50% [WP] P/P)	Fresales, vid, tomate	Botrytis

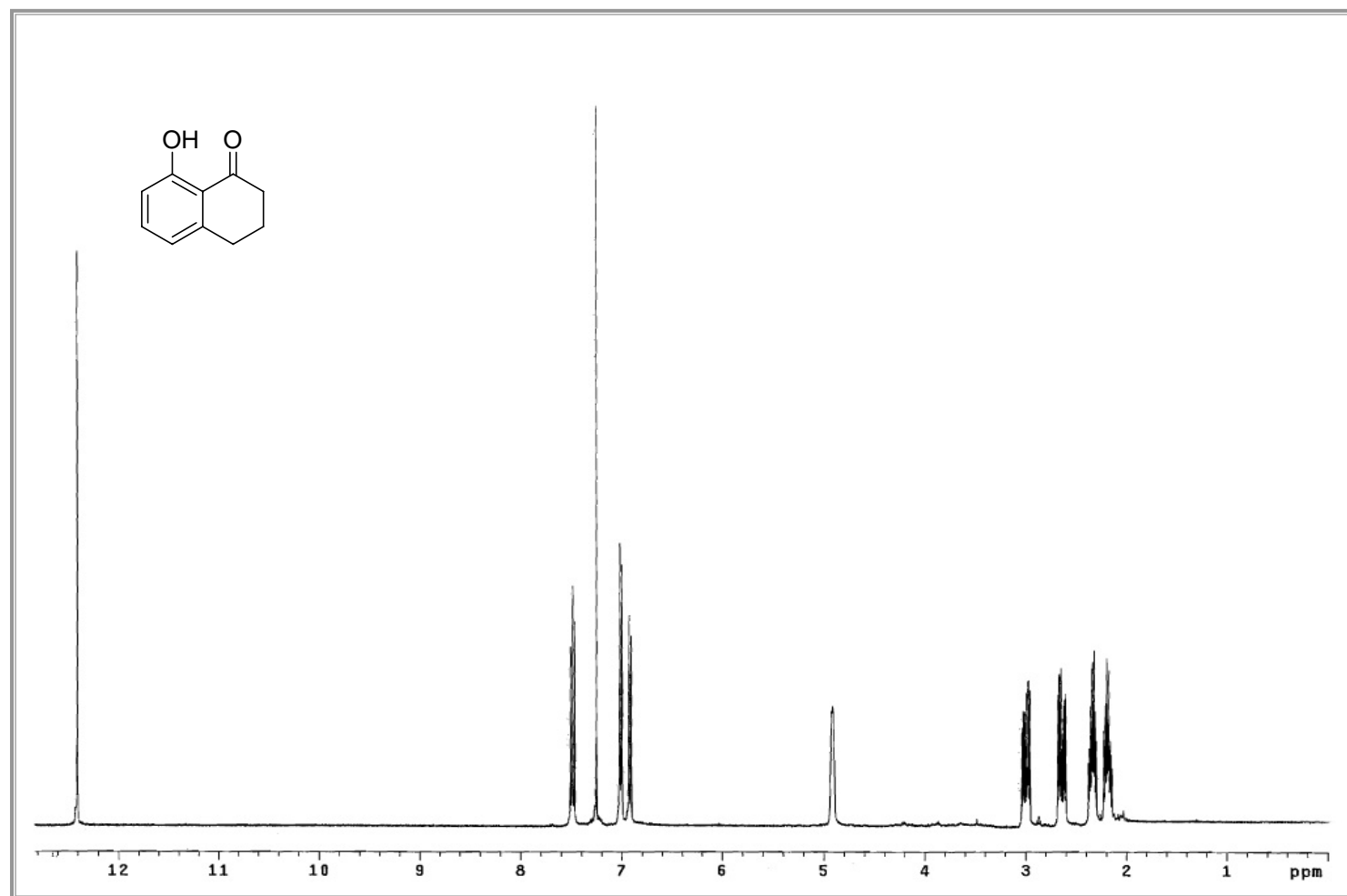
Miclobutanil (apartado II.2.4)		
Nombre comercial (Composición)	Cultivo/especie	Plaga
FULMINAL-12 (Miclobutanil 12.5% [EC] P/V)	Rosal, nogal	Antracnosis
SECRET 12.5 EC, NERO 12, LAITRI, POLTIX, MICLOBUTAL 12.5, TESIS 12.5 EC, FUNGIBEN, MYCLON 125, LATINO, TURMIX, NILBU (Miclobutanil 12.5% [EC] P/V)	Rosal	Antracnosis



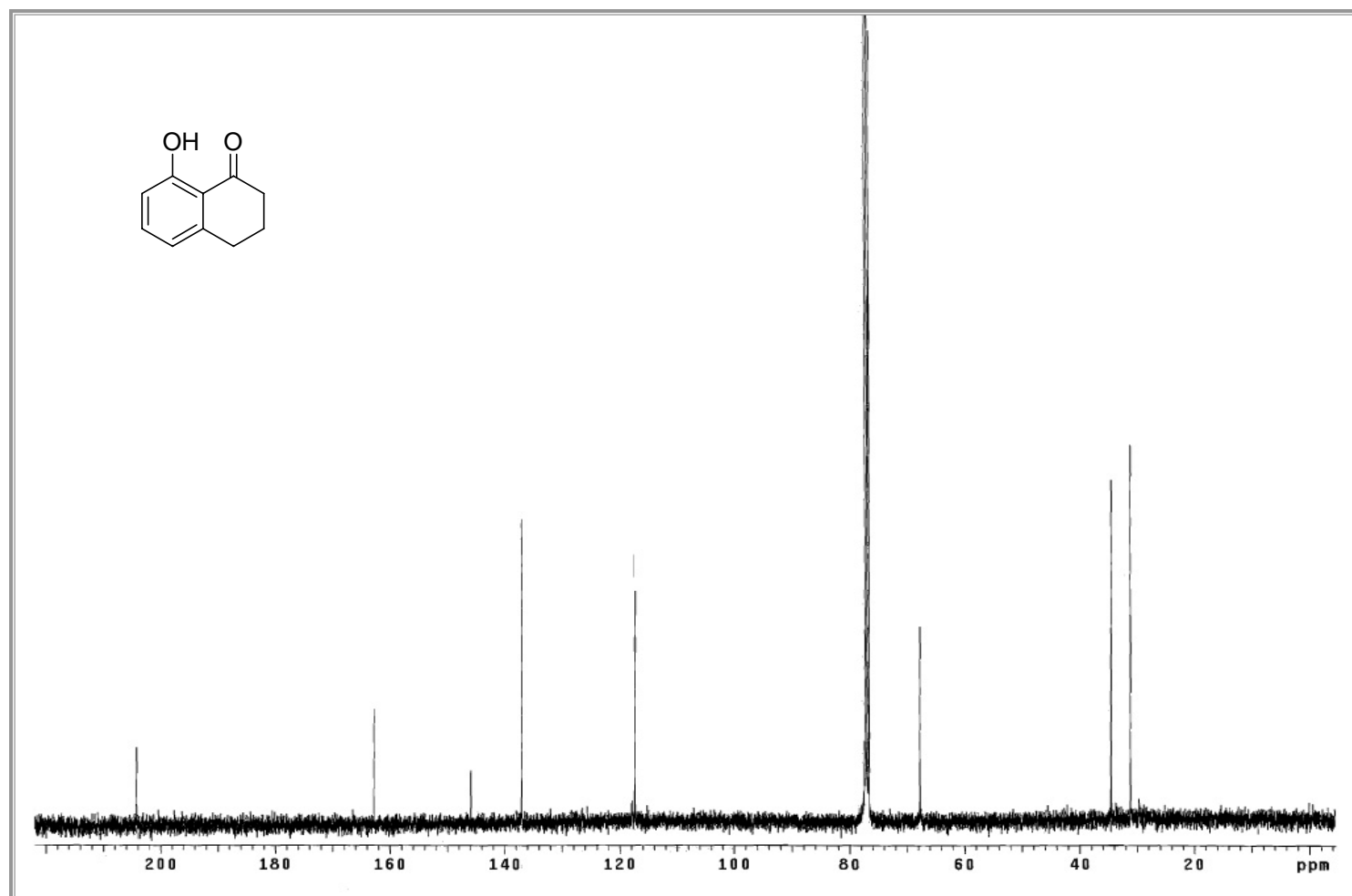
RMN de ^1H de $(-)\text{-}2\text{-}(3',4'\text{-diacetoxifenil})\text{-}3,4\text{-diacetoxitetrahydrofuran}$ ($(-)\text{-}1\text{a}$).



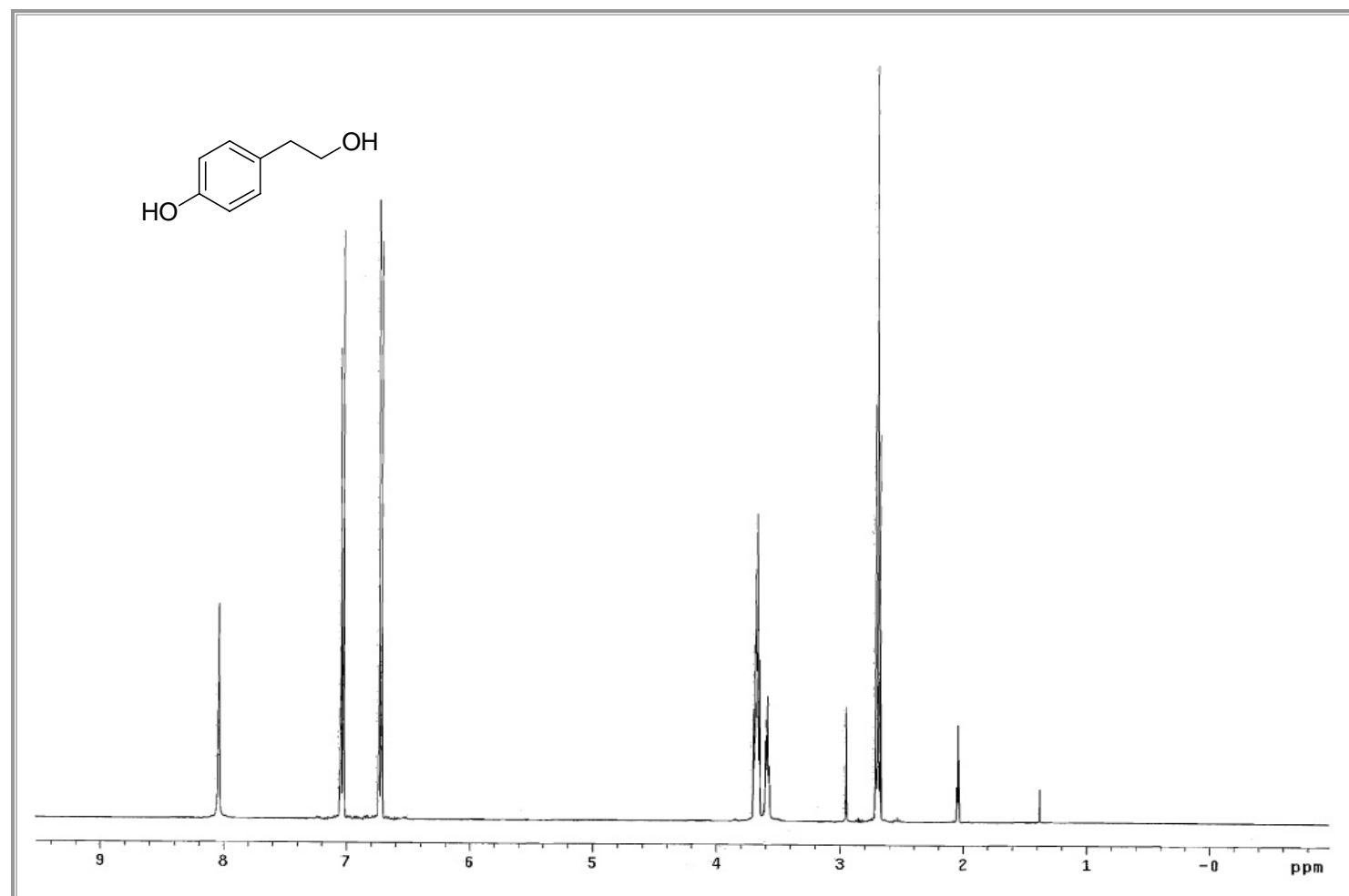
RMN de ^{13}C de (-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofuran ((-)-**1a**).



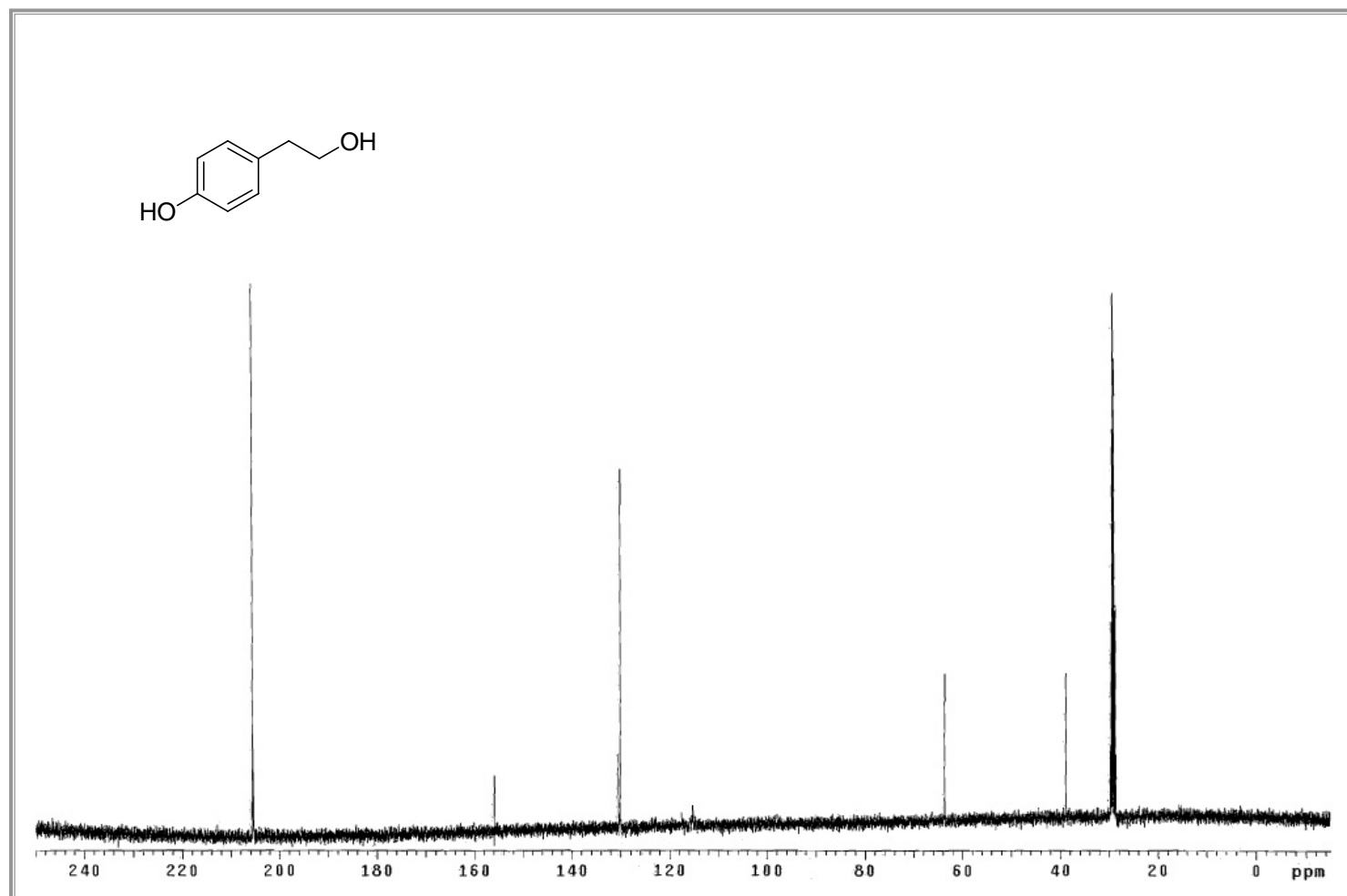
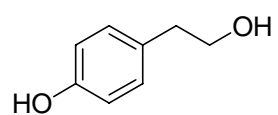
RMN de ^1H de (-)-isosclerona (IX).



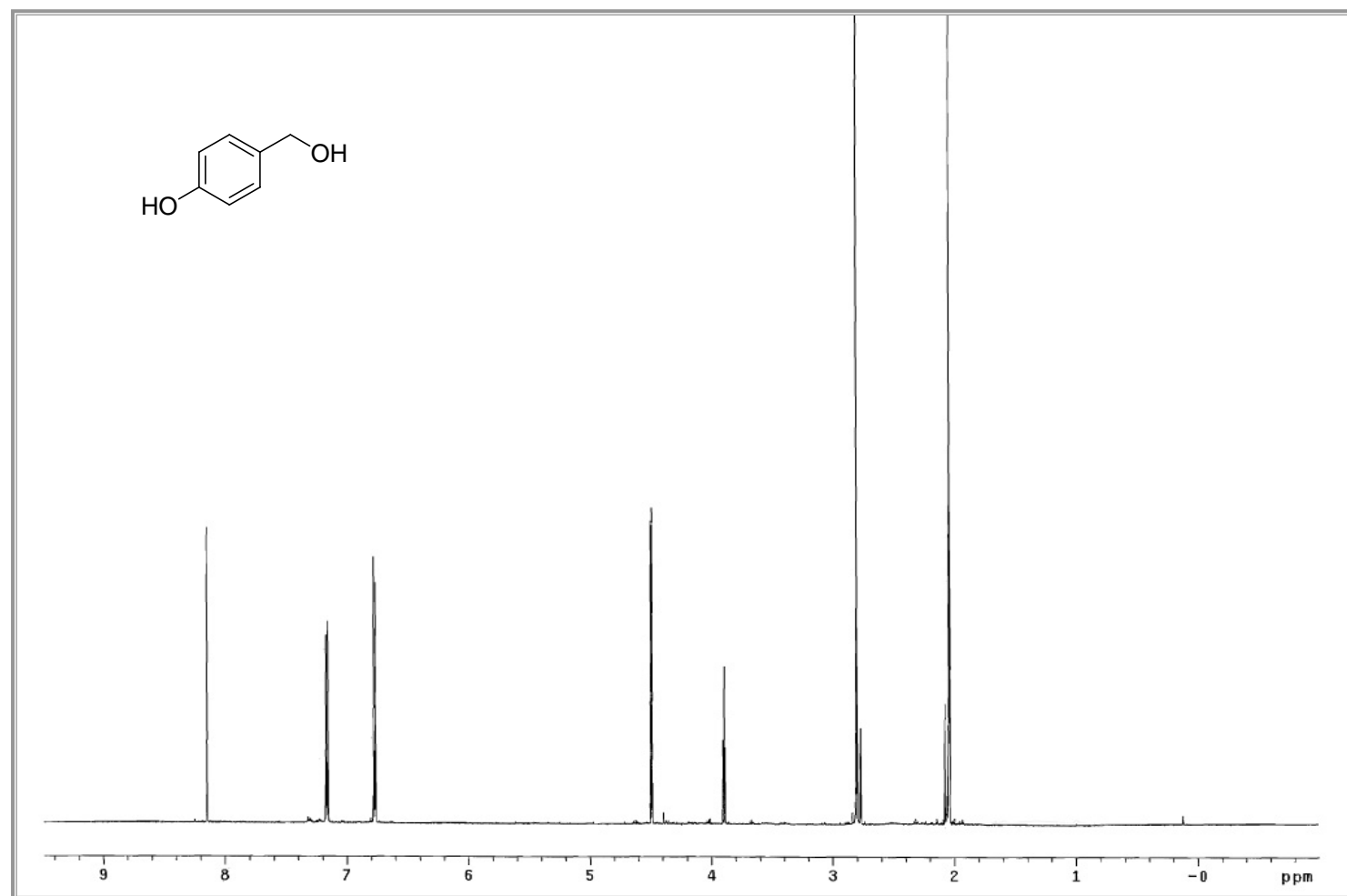
RMN de ^{13}C de (-)-isoscleron (IX).



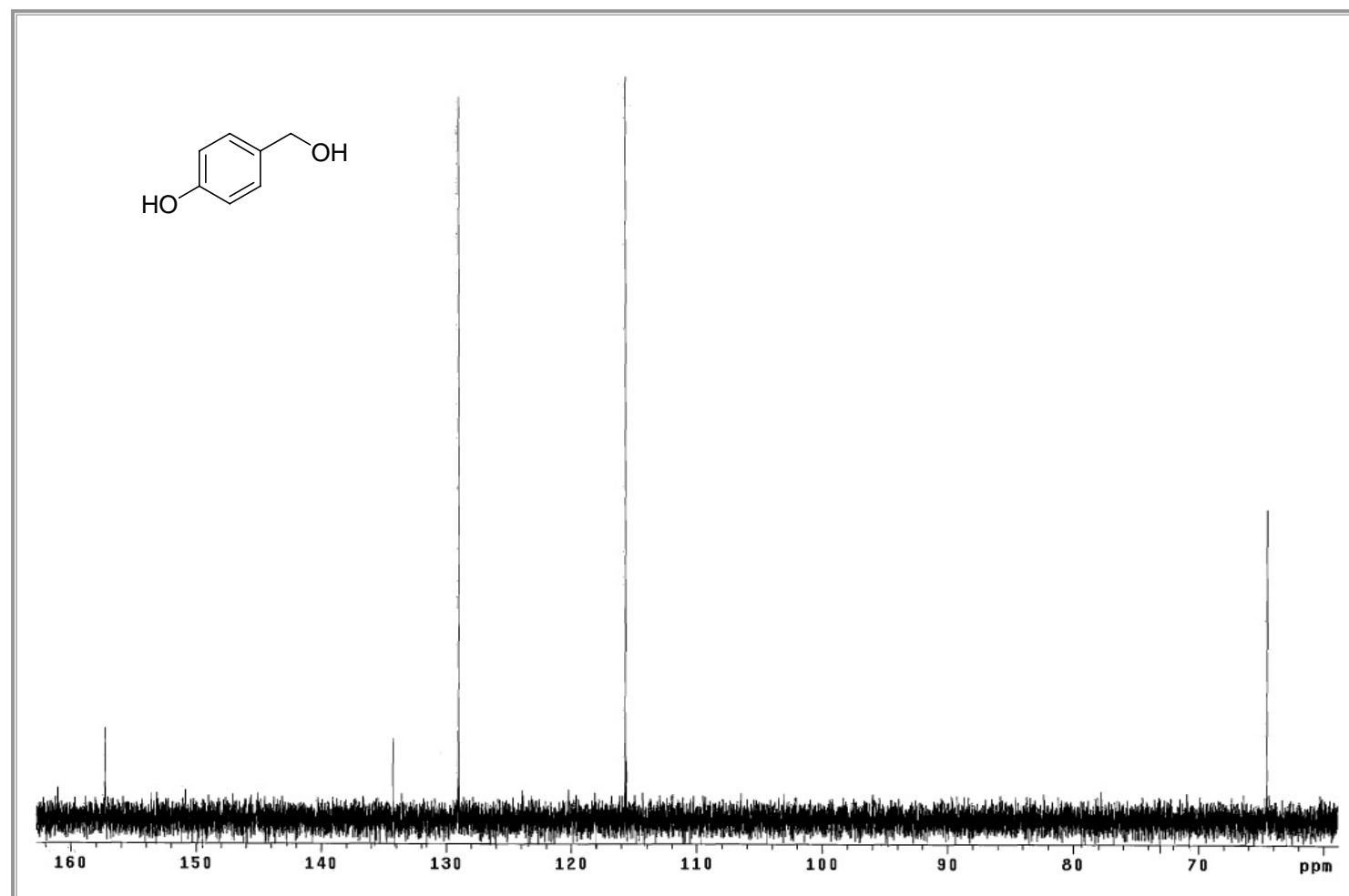
RMN de ^1H de tirosol (X).



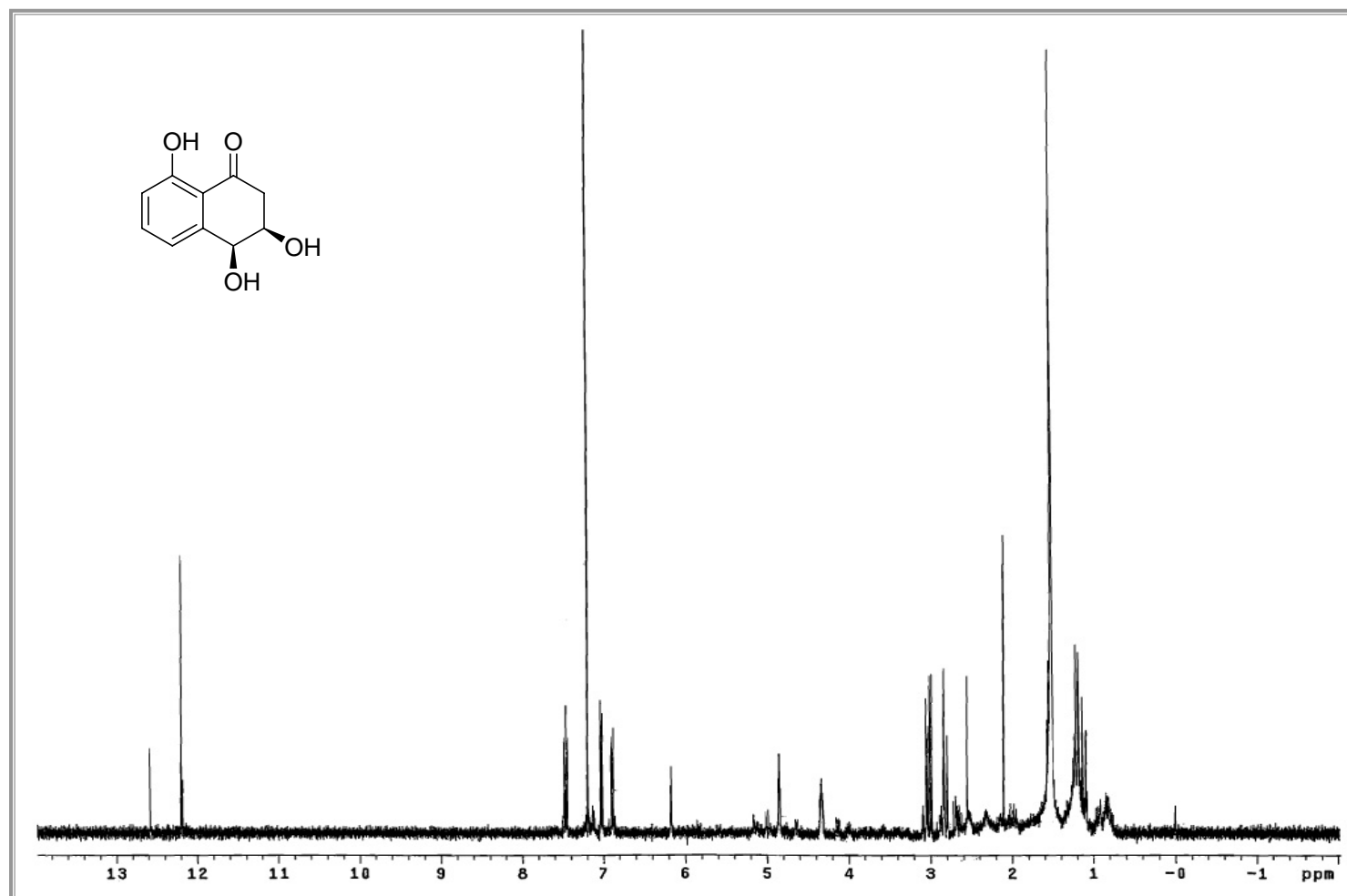
RMN de ^{13}C de tirosol (X).



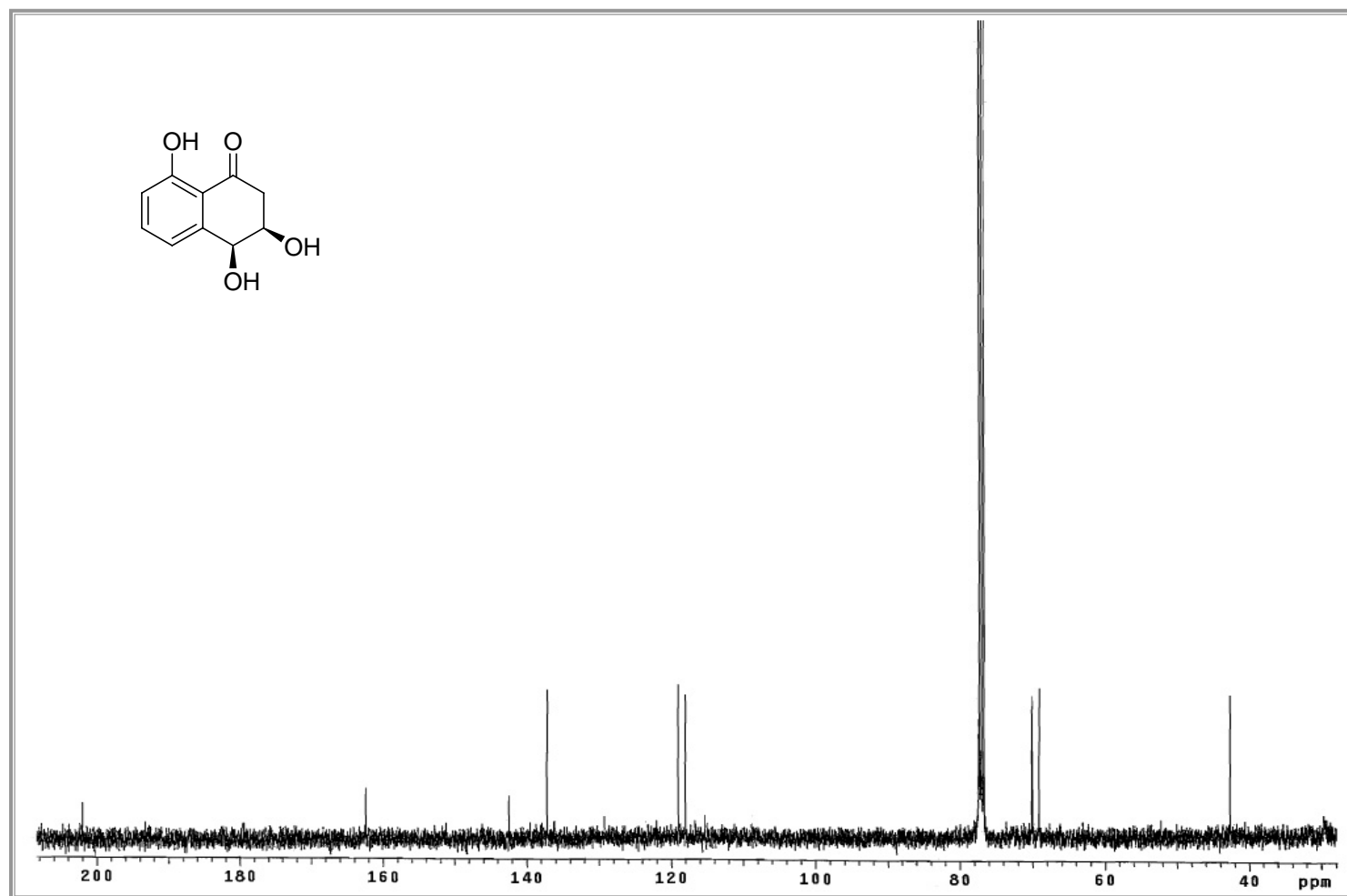
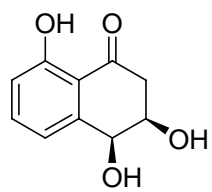
RMN de ^1H de alcohol 4-hidroxibencílico (XI).



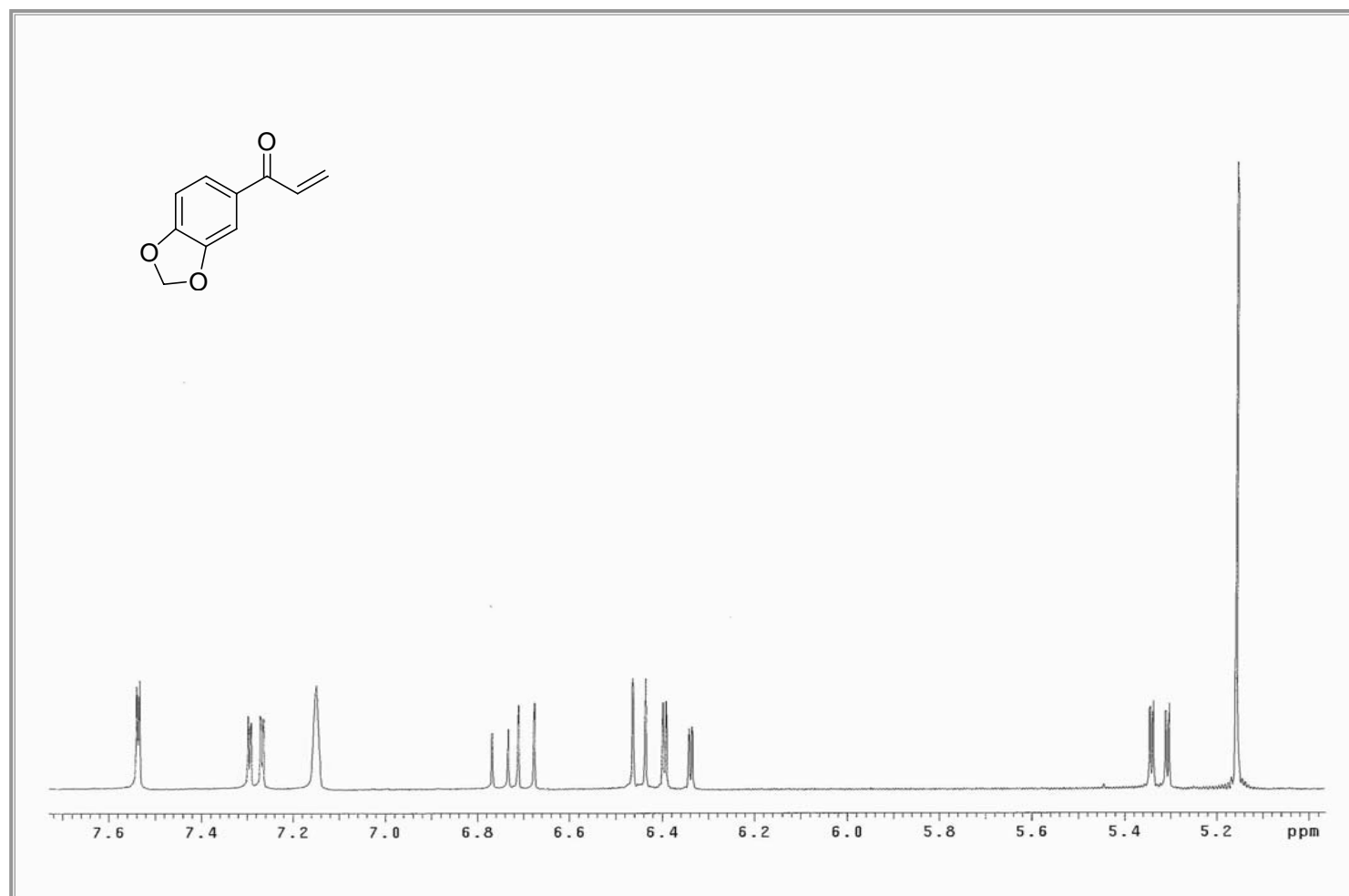
RMN de ^{13}C de alcohol 4-hidroxibencílico (XI).



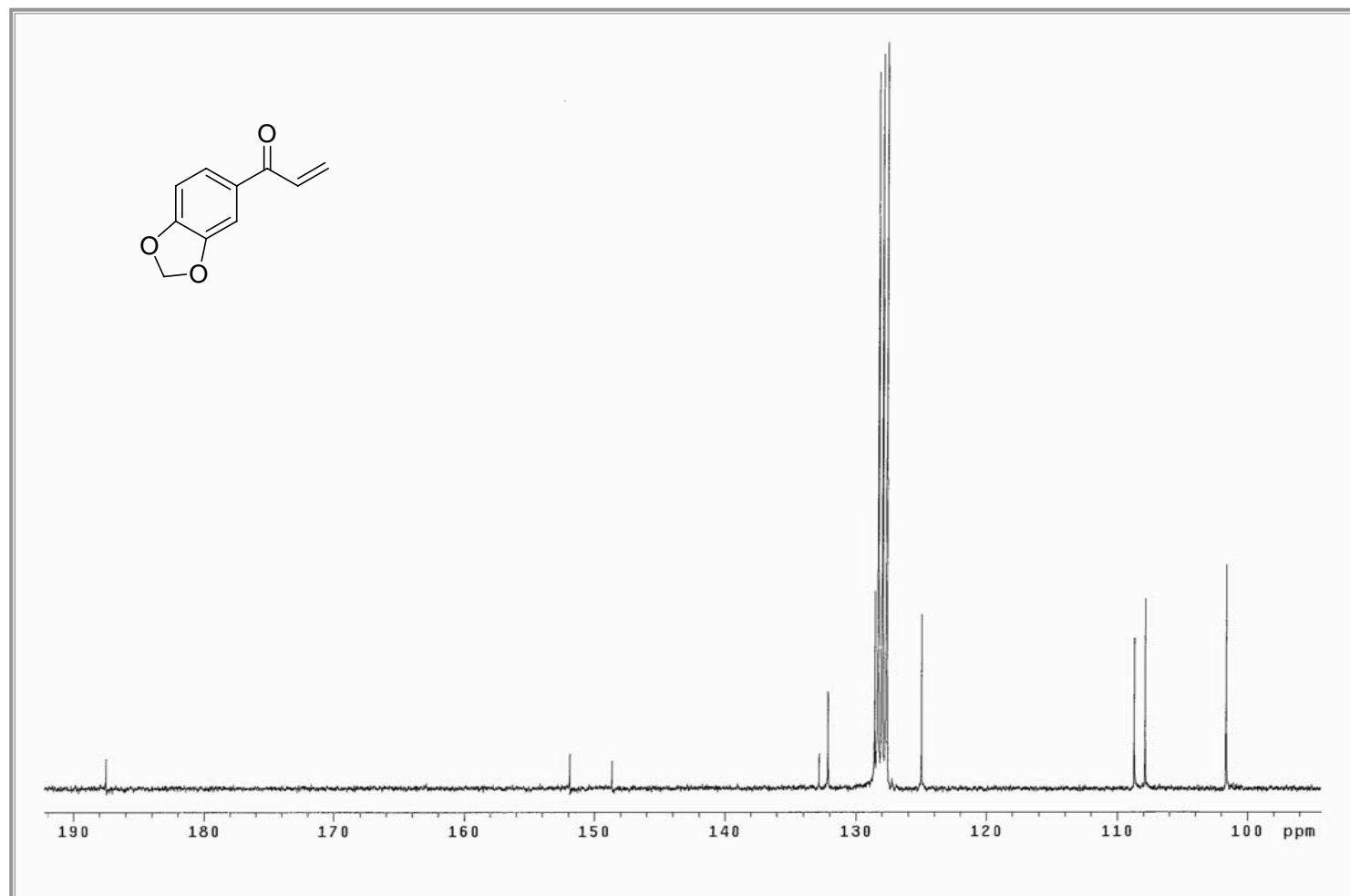
RMN de ^1H de (+)-3-hidroxiisclerona (XII).



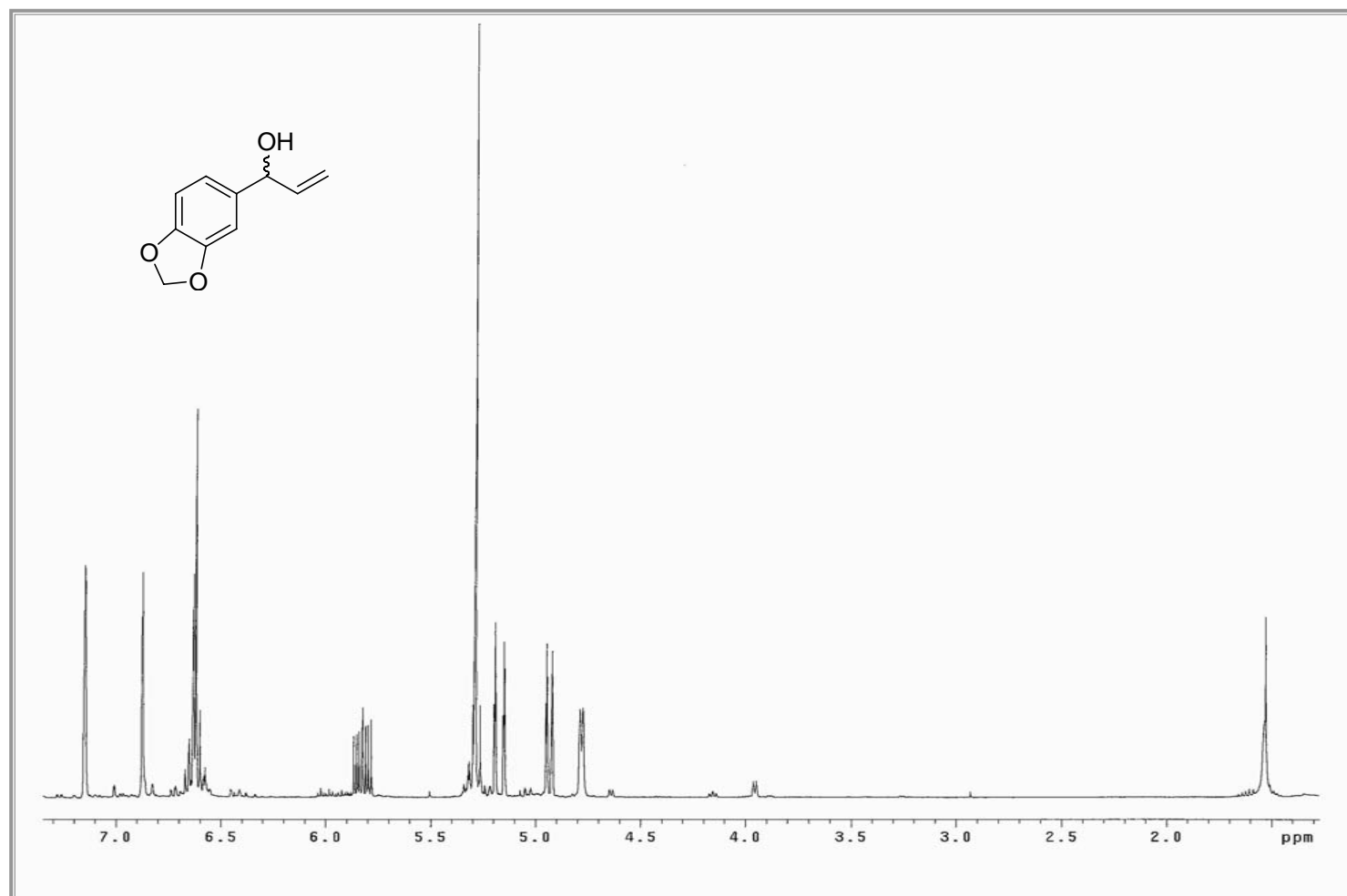
RMN de ^{13}C de (+)-3-hidroxiisoclaron (XII).



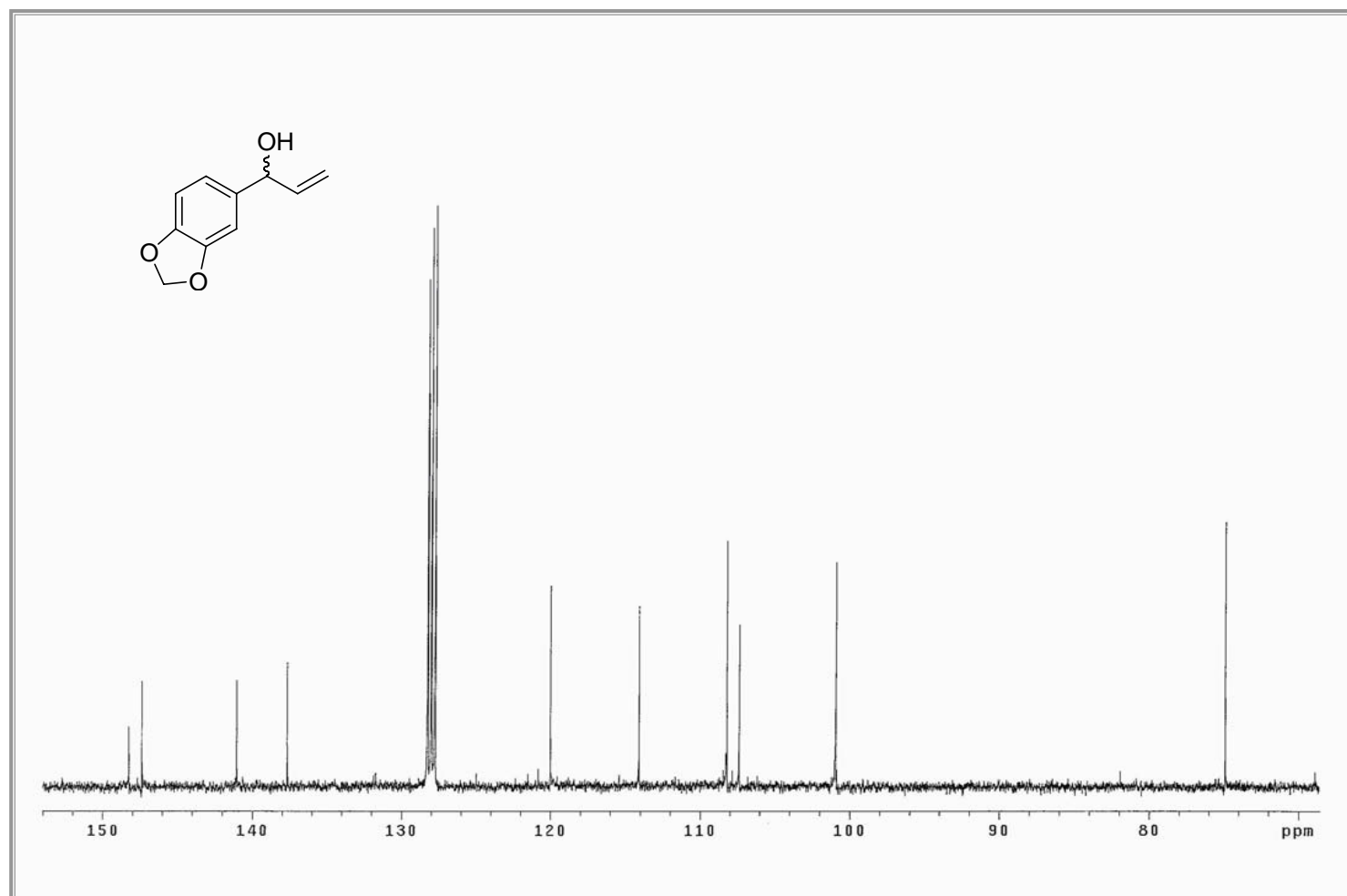
RMN de ¹H de 3',4'-(metilendioxi)fenil vinil cetona (**2**).



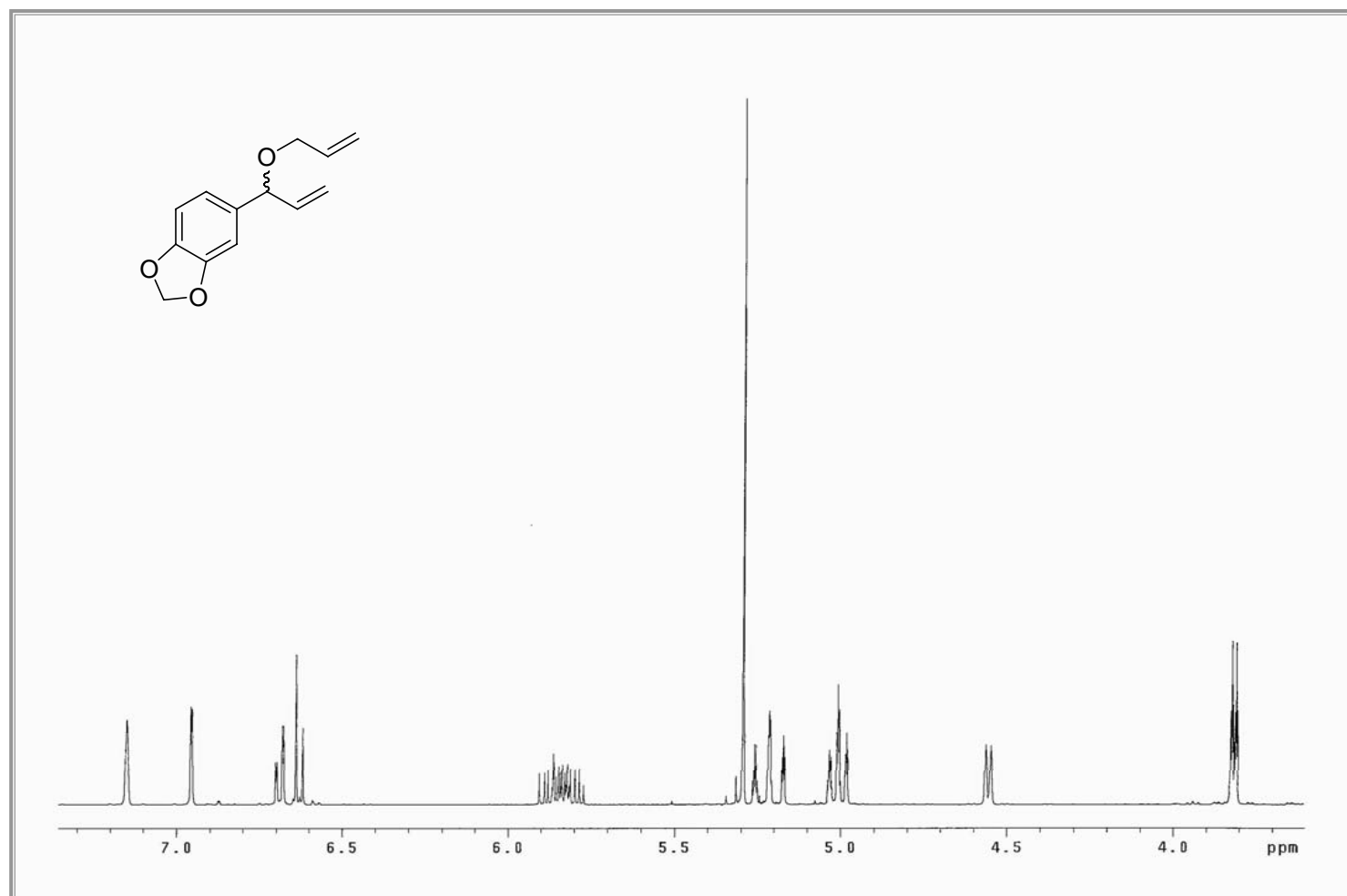
RMN de ^{13}C de 3',4'-(metilendioxi)fenil vinil cetona (**2**).



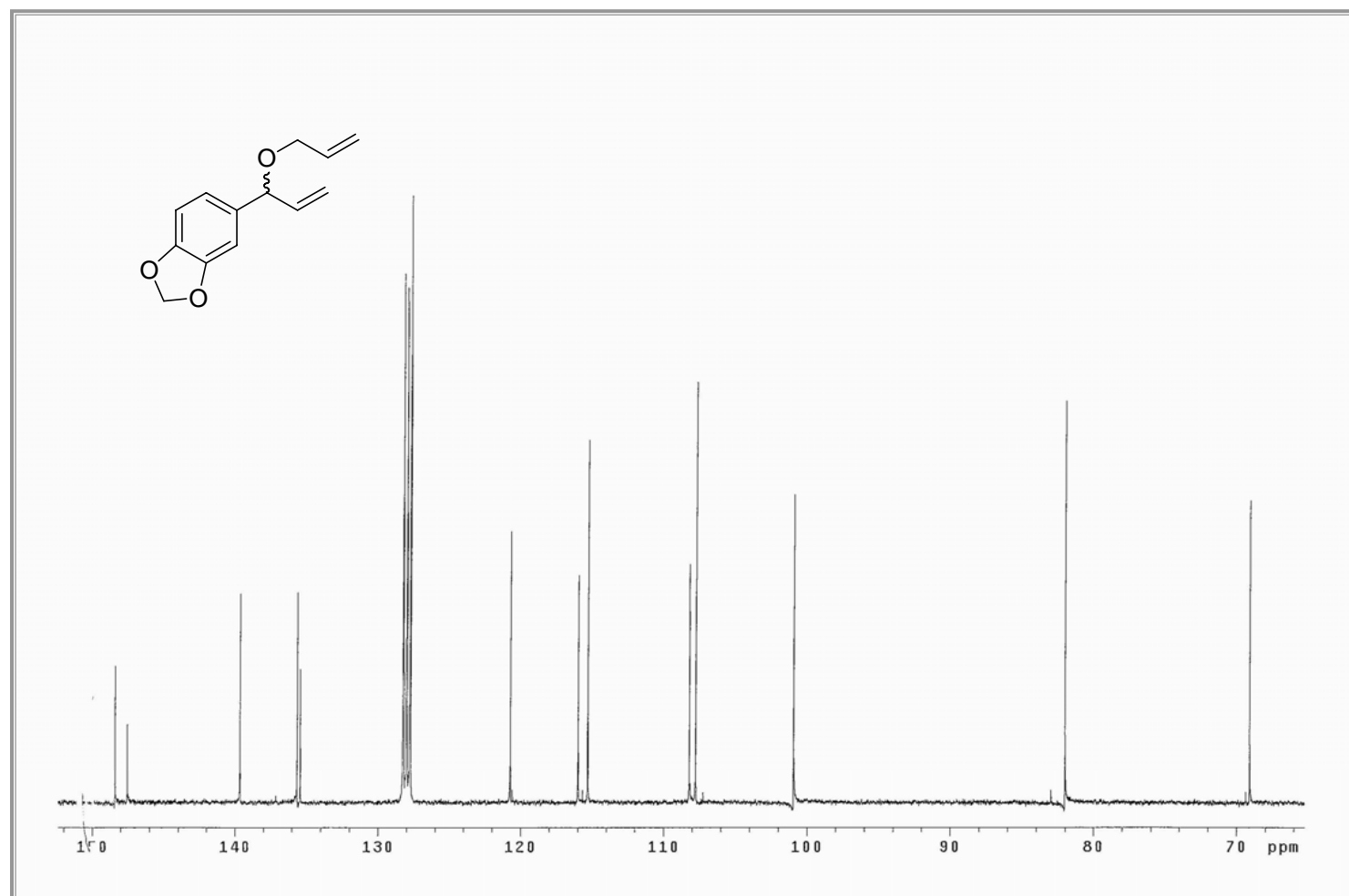
RMN de ^1H de 1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-en-1-ol (**3**).



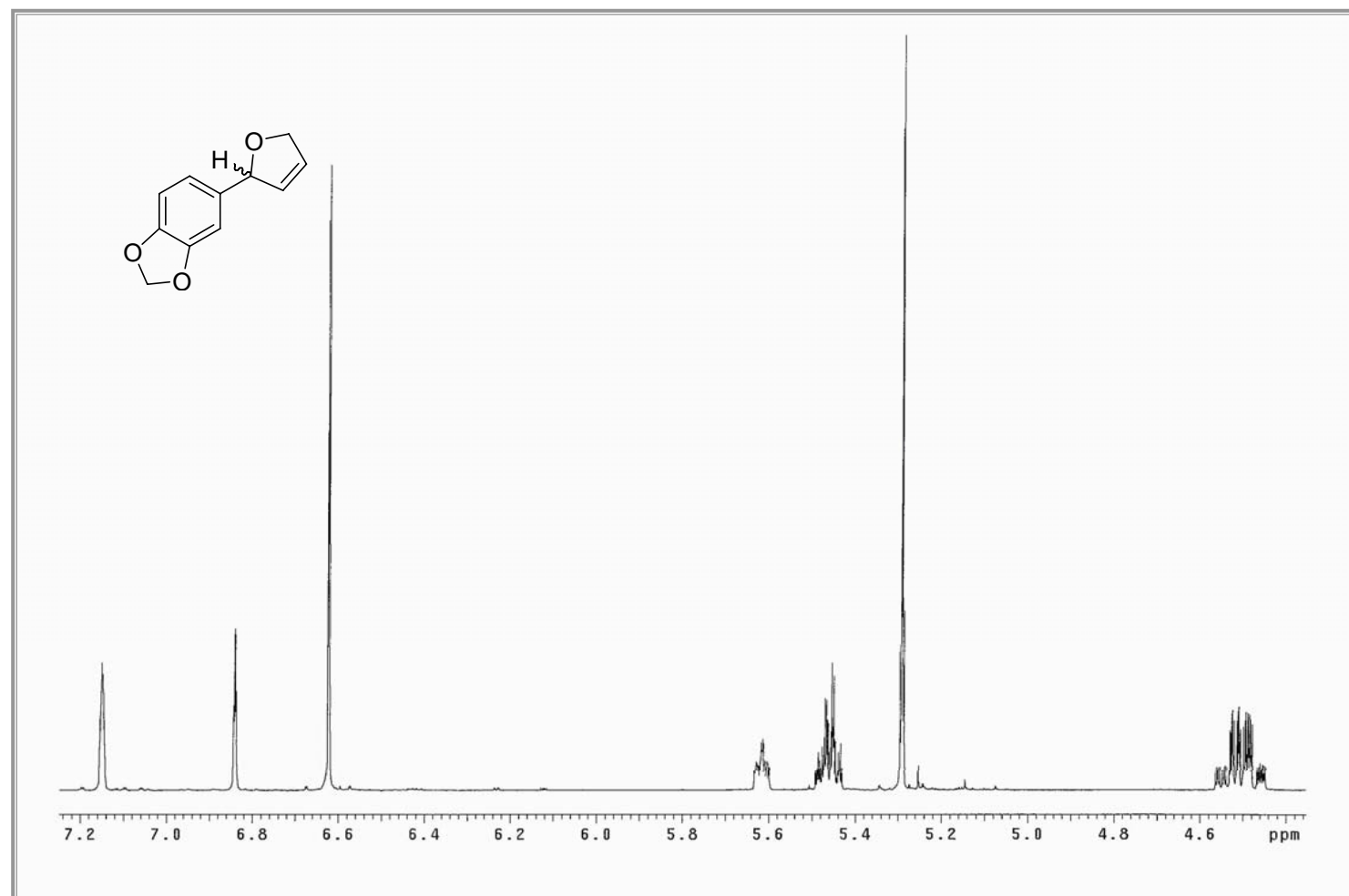
RMN de ^{13}C de 1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-en-1-ol (**3**).



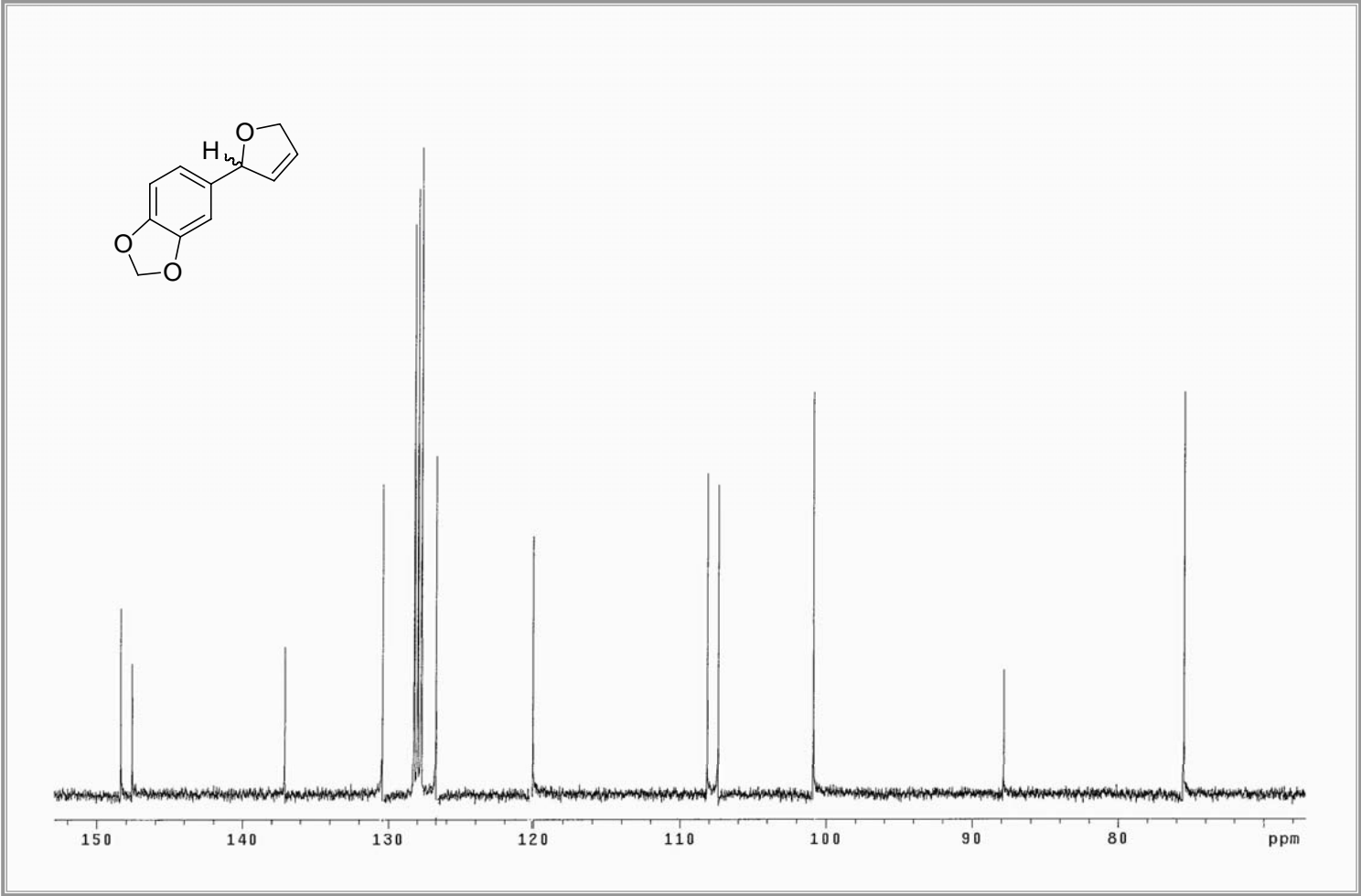
RMN de ¹H de 1-(3',4'-(metilendioxi)fenil)prop-2-enil alil éter (4).



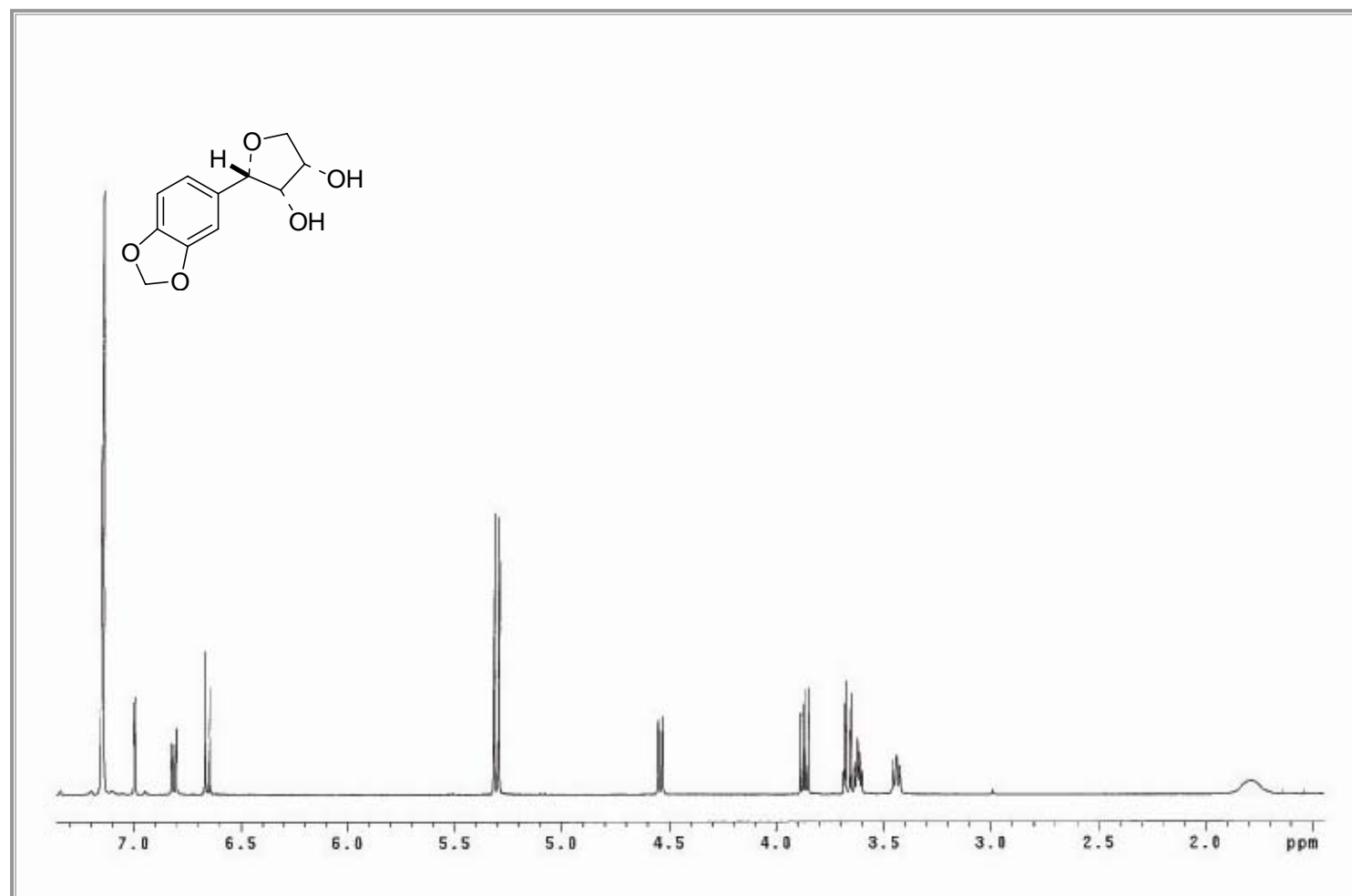
RMN de ^{13}C de 1-(3',4'-(méthylendioxy)phényle)prop-2-ényle allyl éther (**4**).



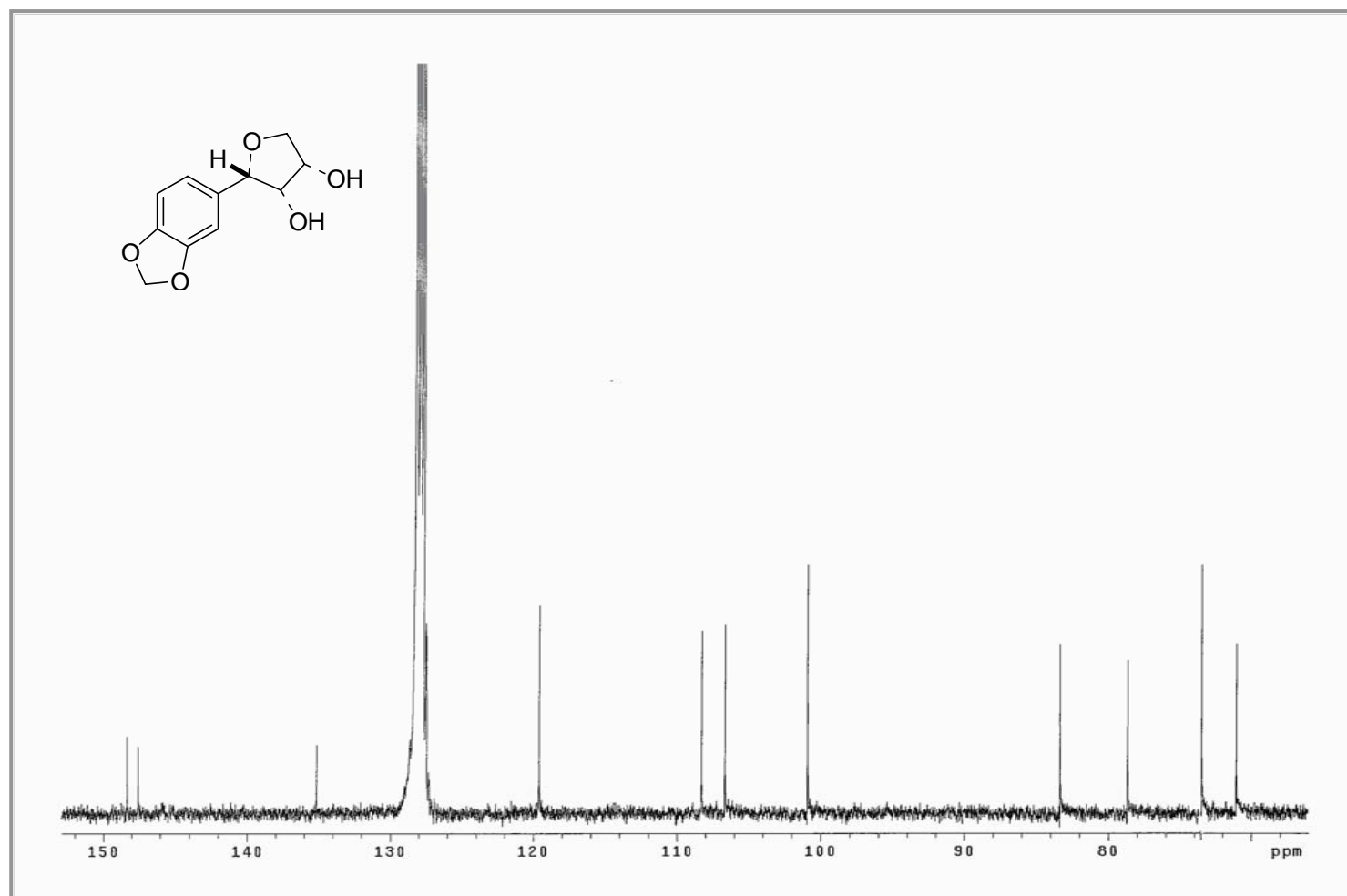
RMN de ^1H de 2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano (**5**).



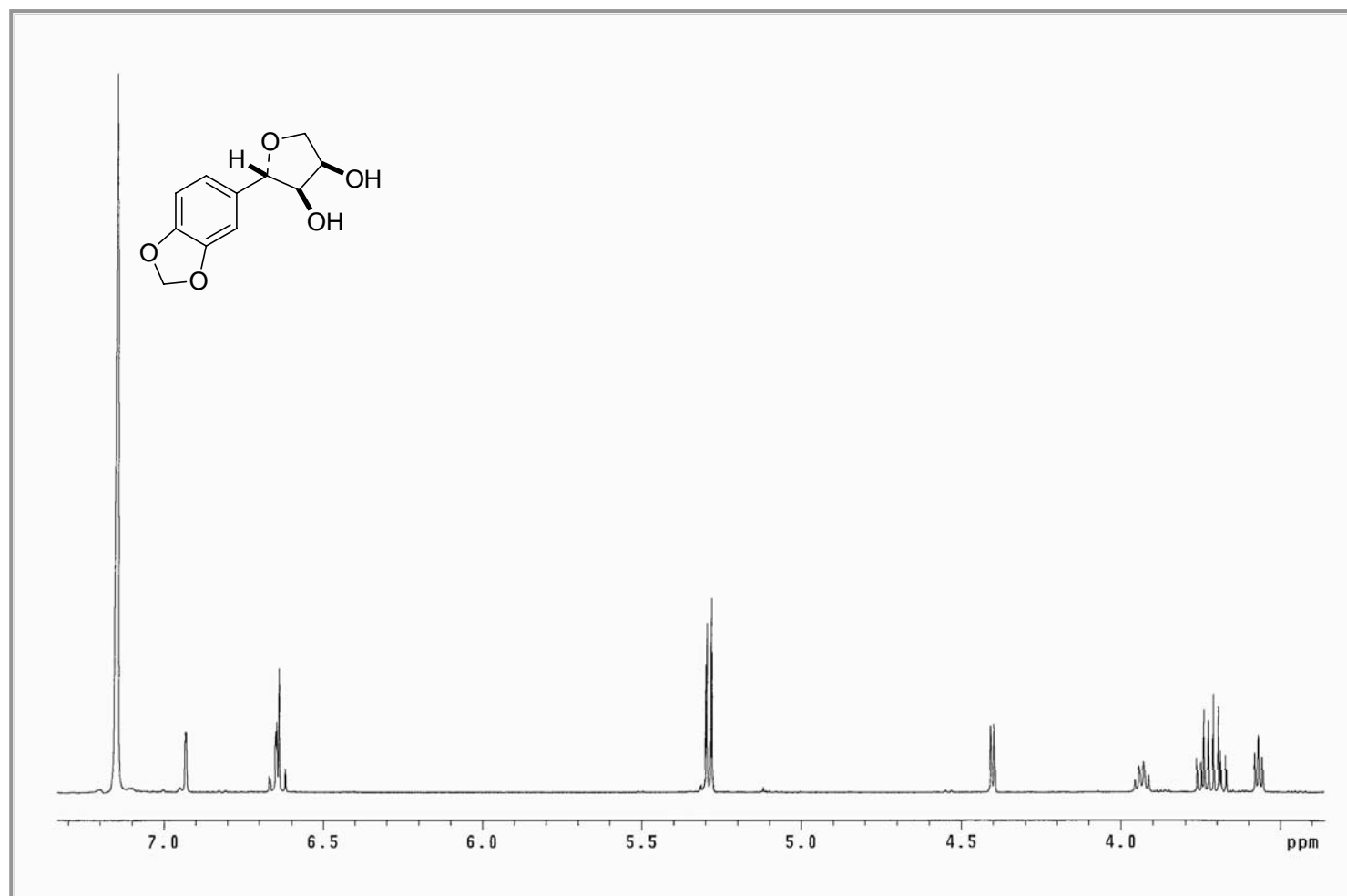
RMN de ^{13}C de 2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-2,5-dihidrofurano (**5**).



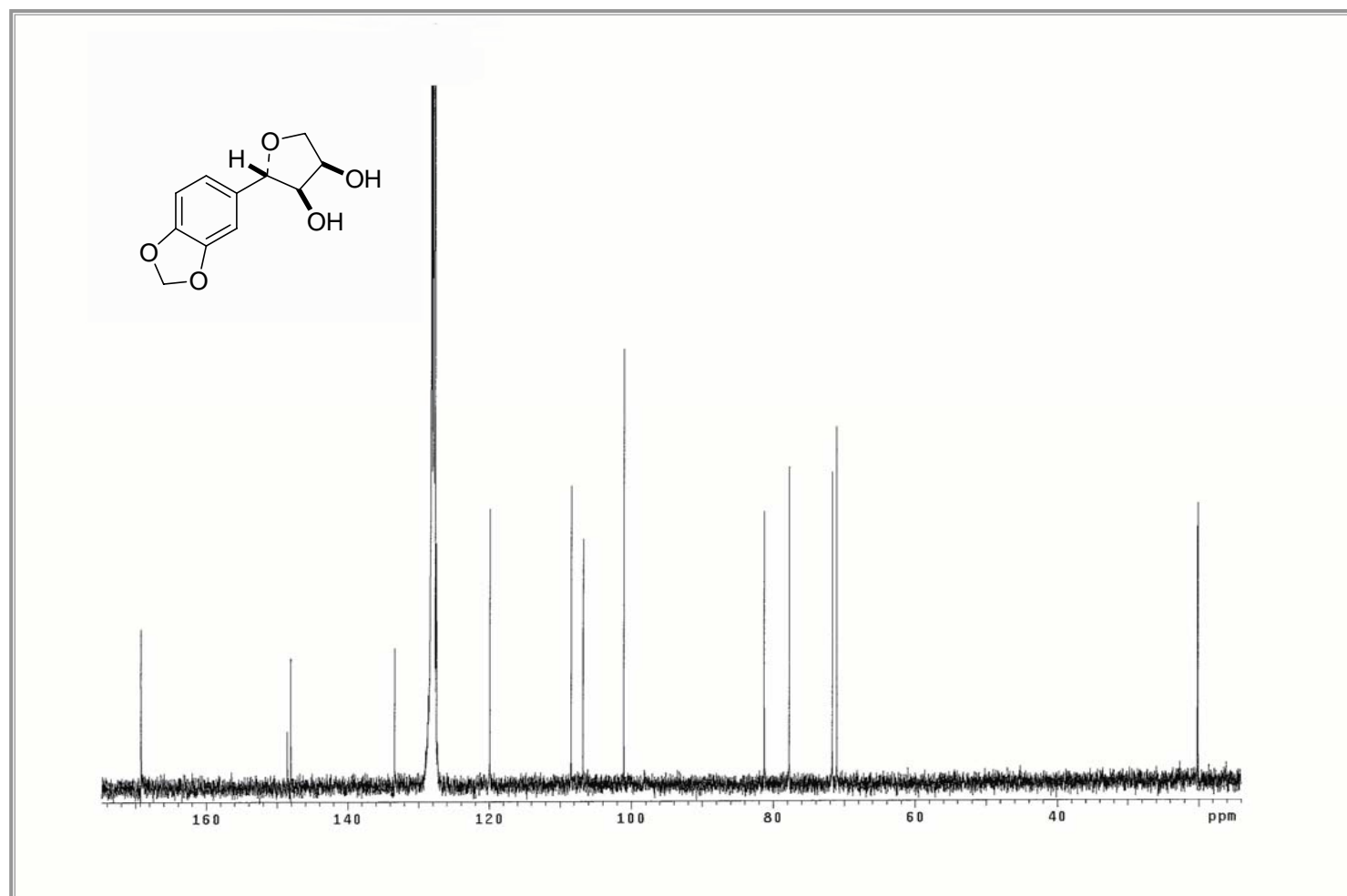
RMN de ^1H de (2*S*(*R*),3*R*(*S*),4*S*(*R*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-dihidrofurano-3,4-diol ((\pm)-**6a**).



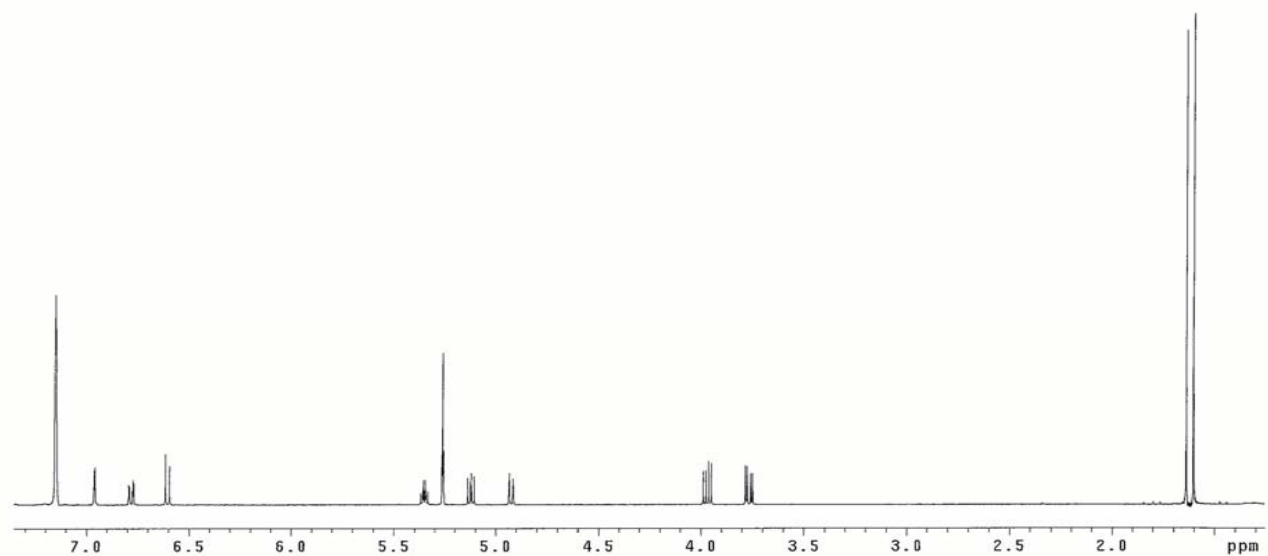
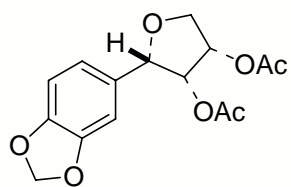
RMN de ^{13}C de $(2S(R),3R(S),4S(R))$ -2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-dihidrofurano-3,4-diol ((\pm)-**6a**).



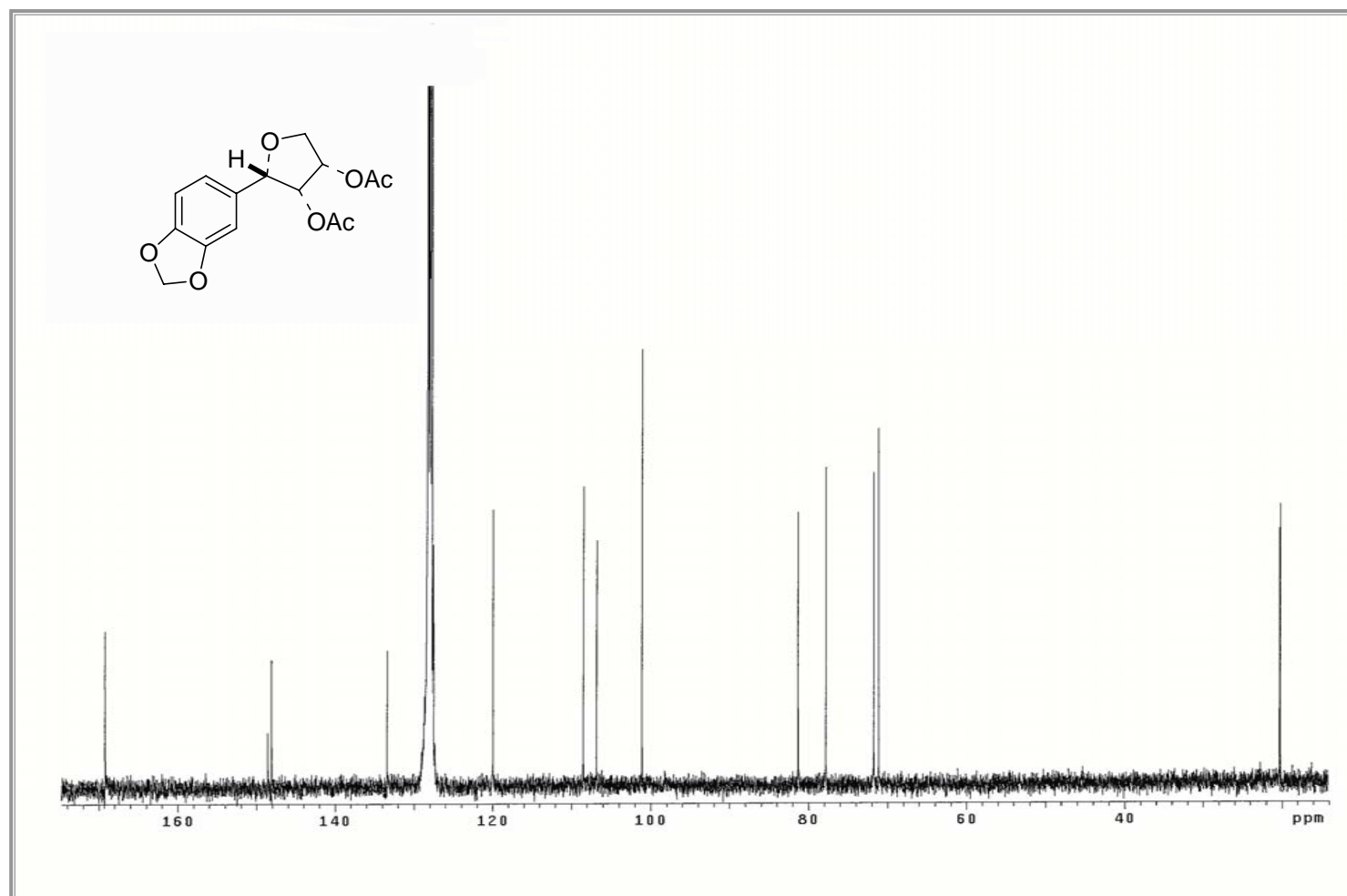
RMN de ^1H de (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-dihidrofurano-3,4-diol ((\pm)-**6b**).



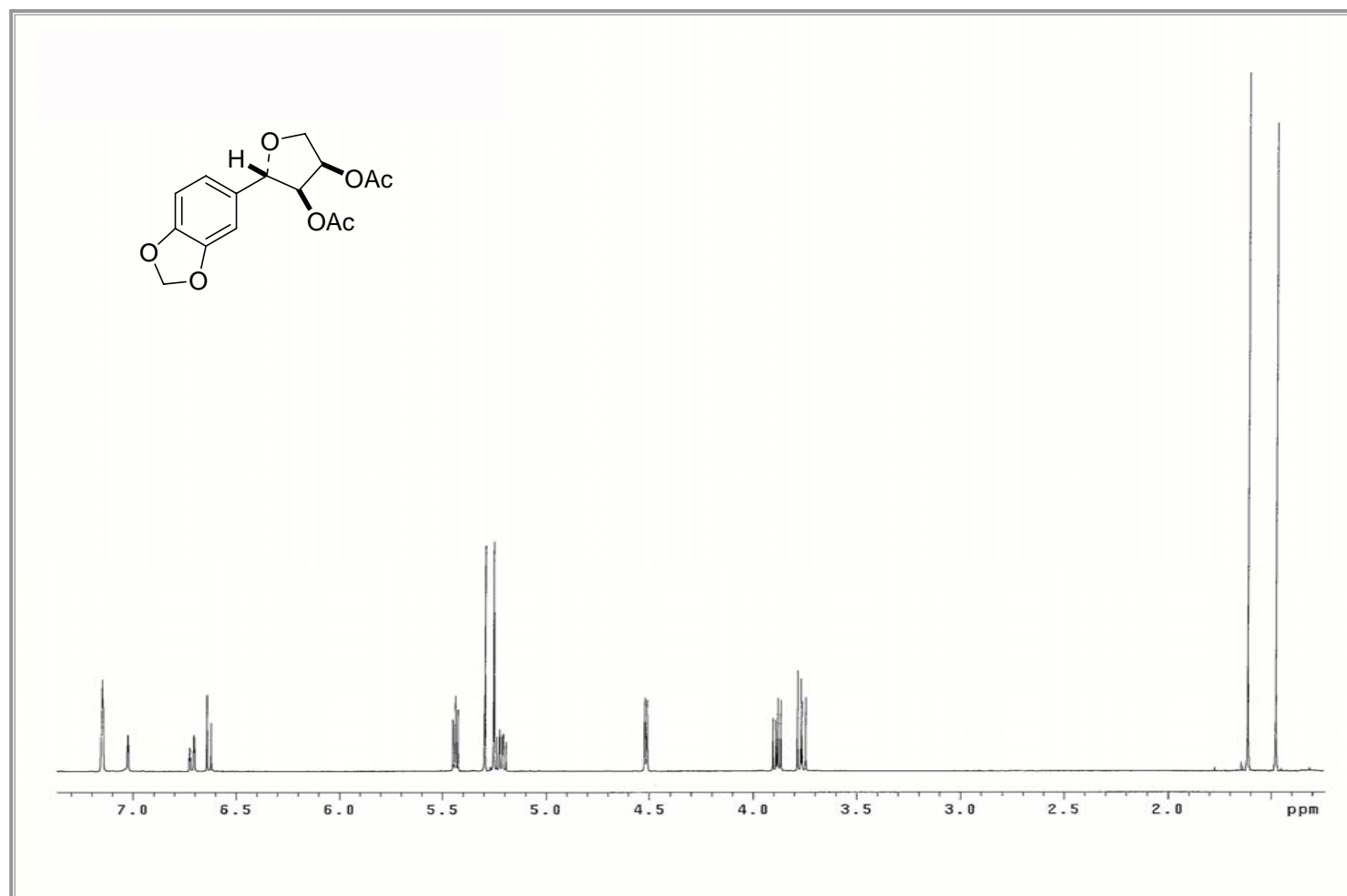
RMN de ^{13}C de (2*S*),3*S*,4*R*)-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)-dihidrofurano-3,4-diol ((±)-**6b**).



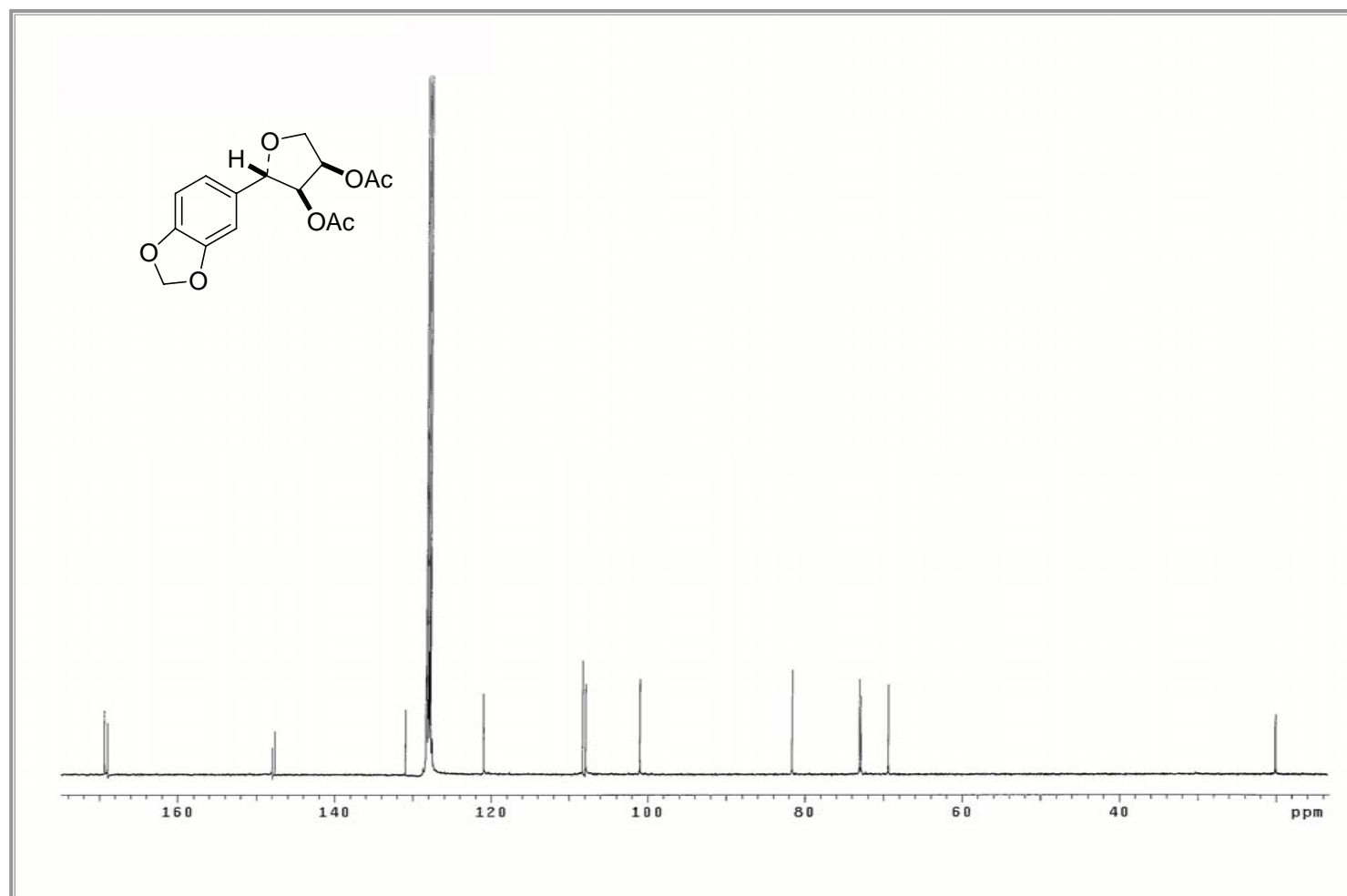
RMN de ^1H del diacetato de $(2S(R),3R(S),4S(R))$ -2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diílo ((\pm)-**7a**).



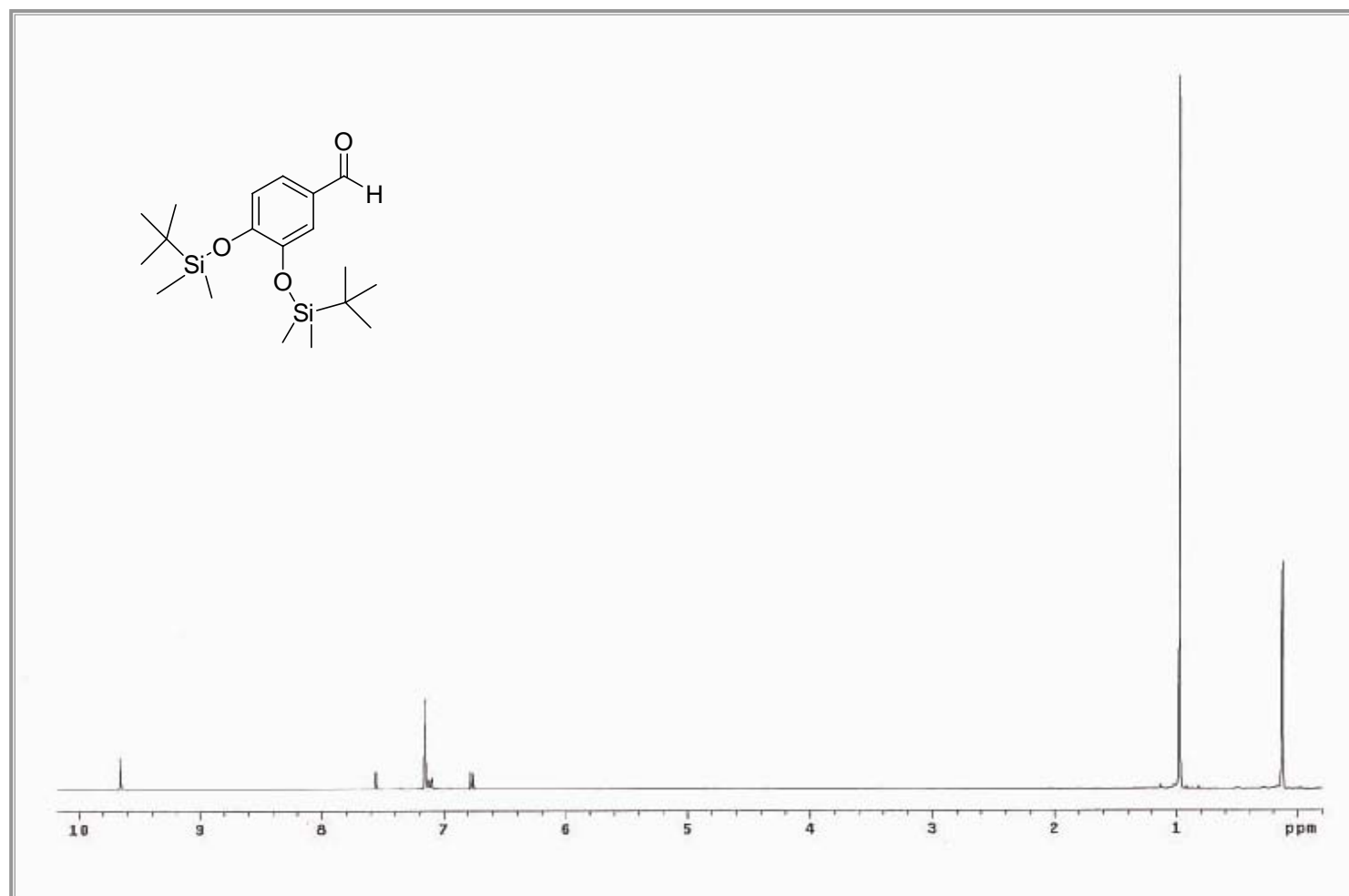
RMN de ^{13}C del diacetato de $(2S(R),3R(S),4S(R))$ -2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diilo ((\pm)-**7a**).



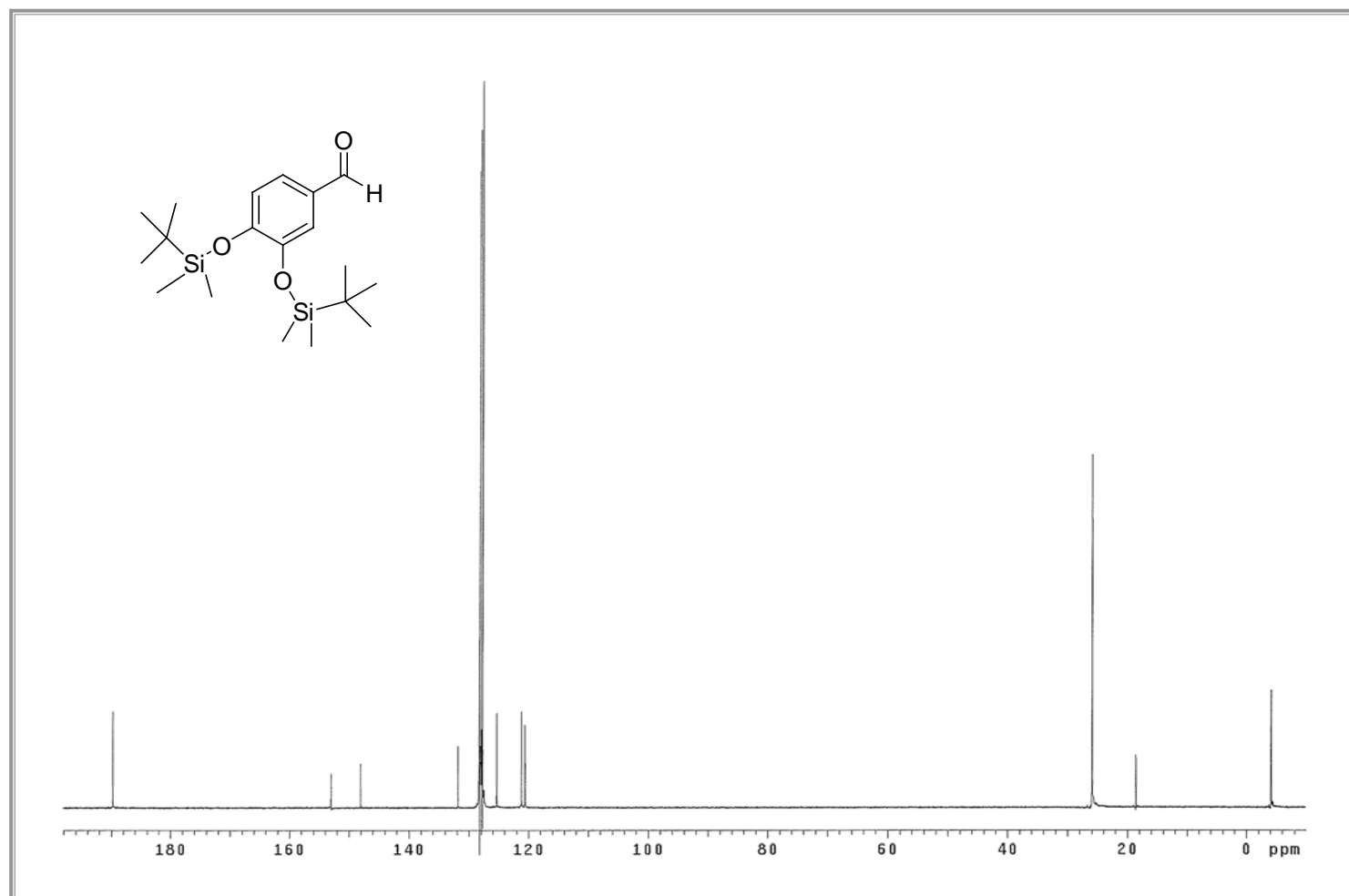
RMN de ¹H del diacetato de (2S(R),3S(R),4R(S))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diolo ((±)-**7b**).



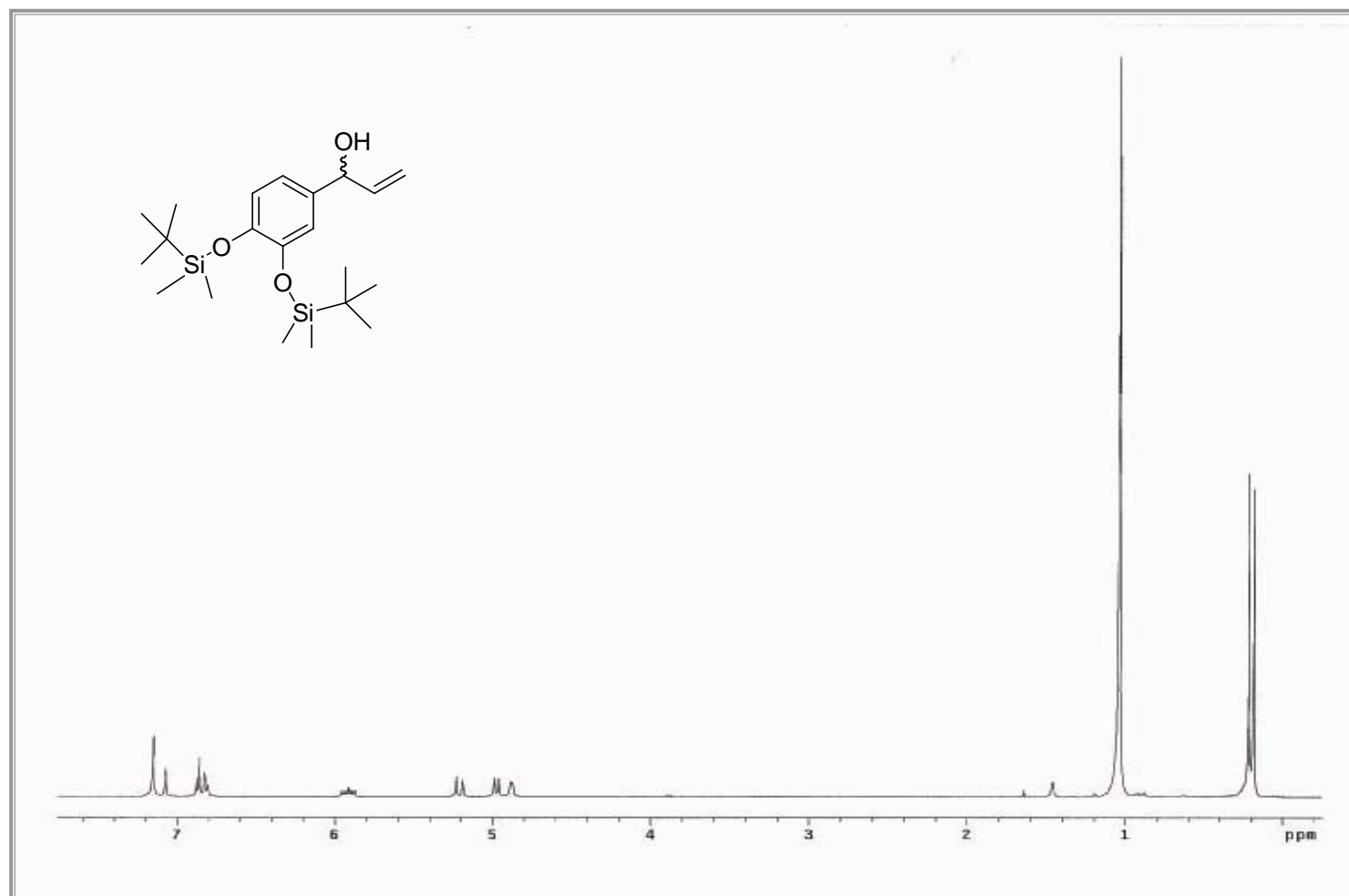
RMN de ¹H del diacetato de (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-(3',4'-(metilendioxi)fenil)tetrahidrofurano-3,4-diilo ((±)-**7b**).



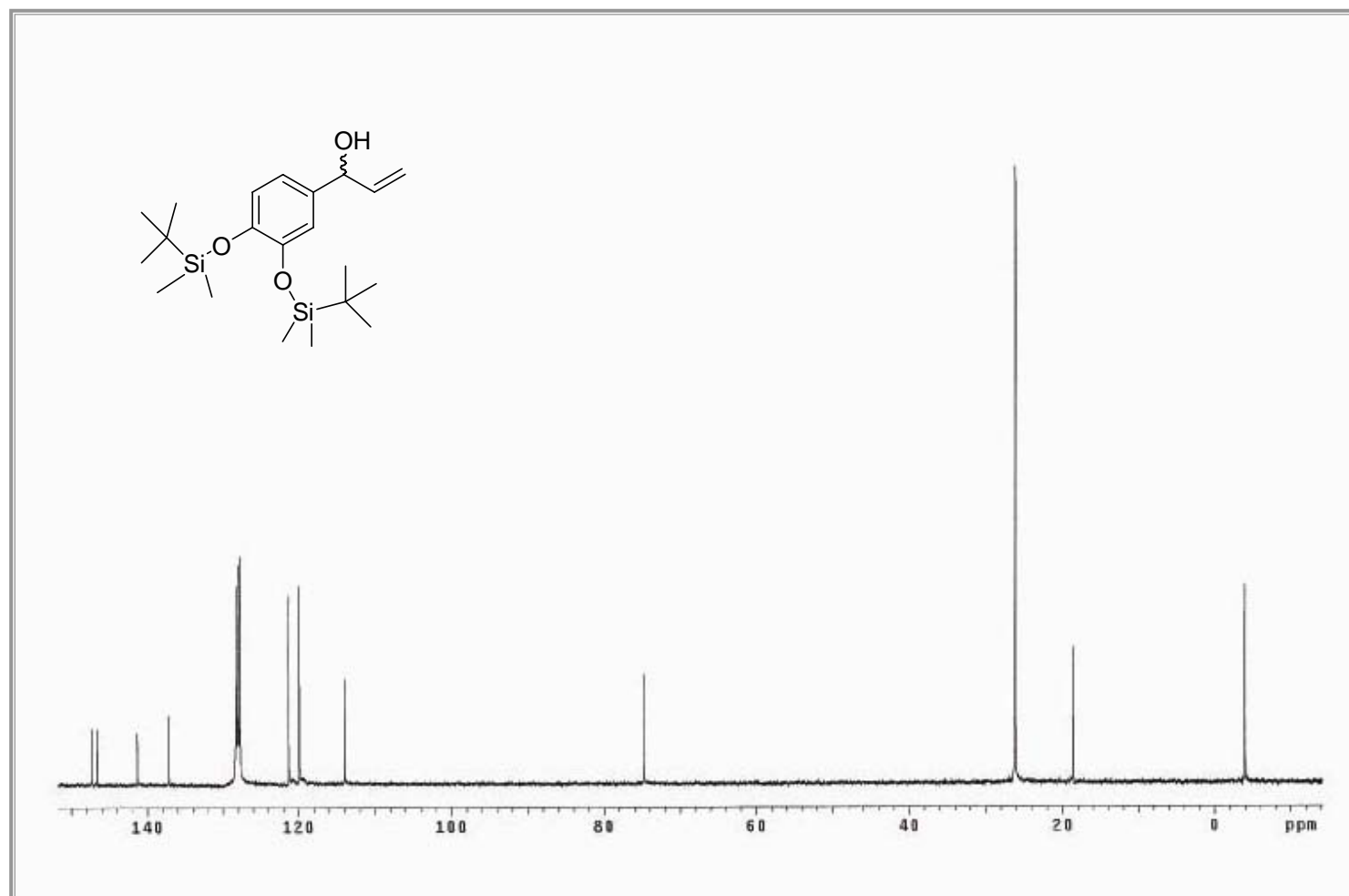
RMN de ¹H de 3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)benzaldehído (9).



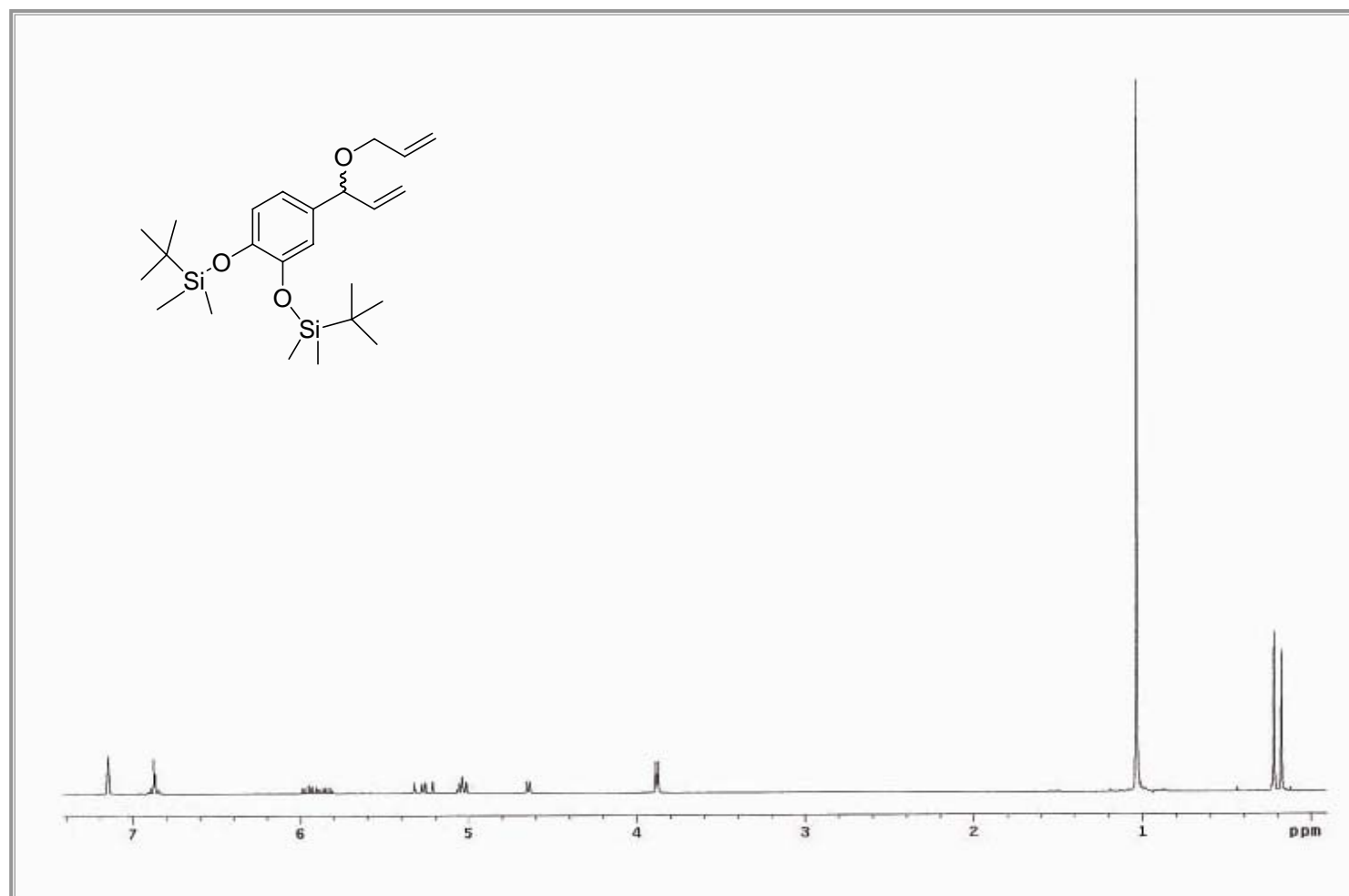
RMN de ^{13}C de 3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)benzaldehído (**9**).



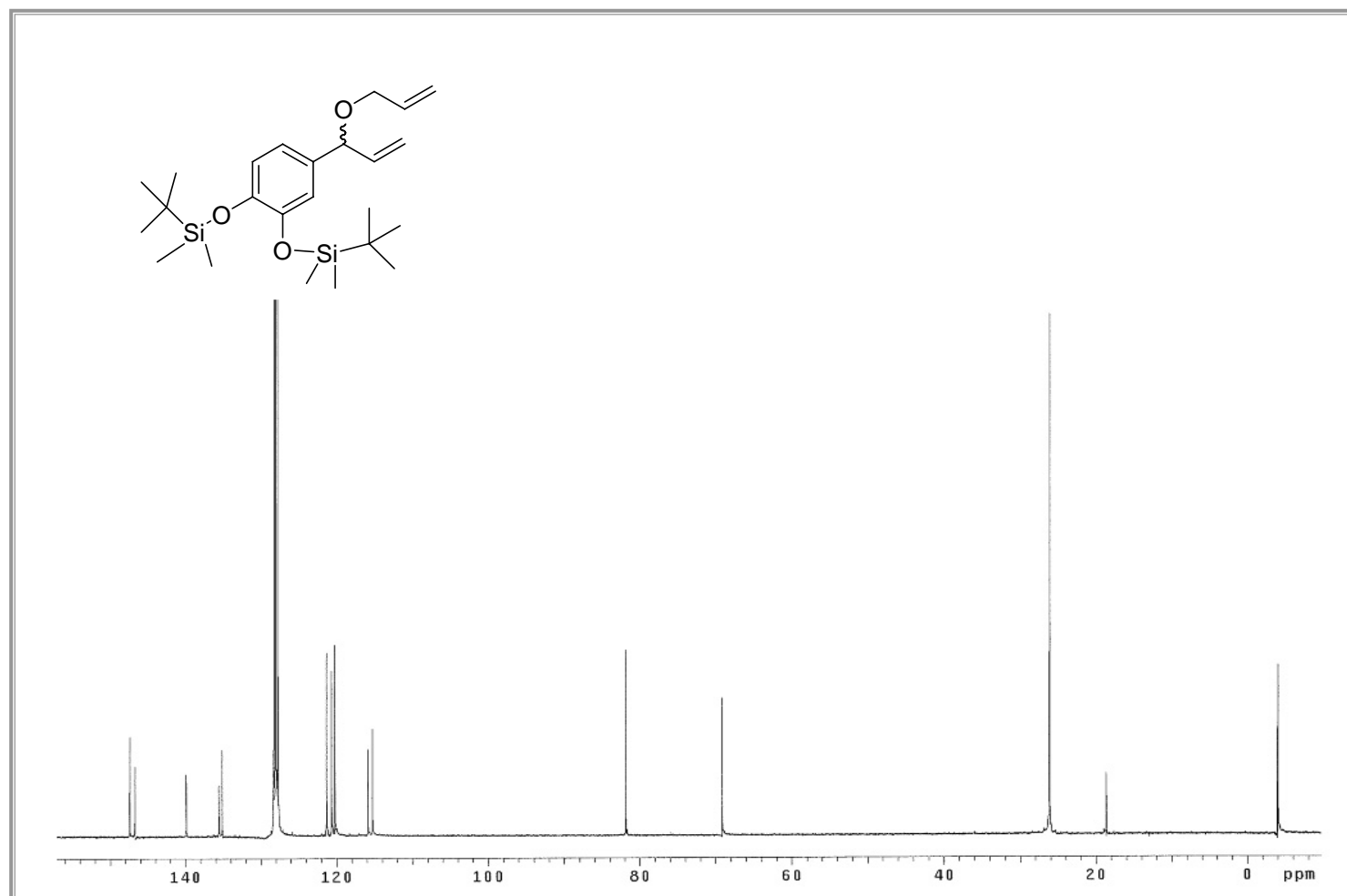
RMN de ^1H de 1-[(3',4'-bis-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)fenil)]prop-2-en-1-ol (**10**).



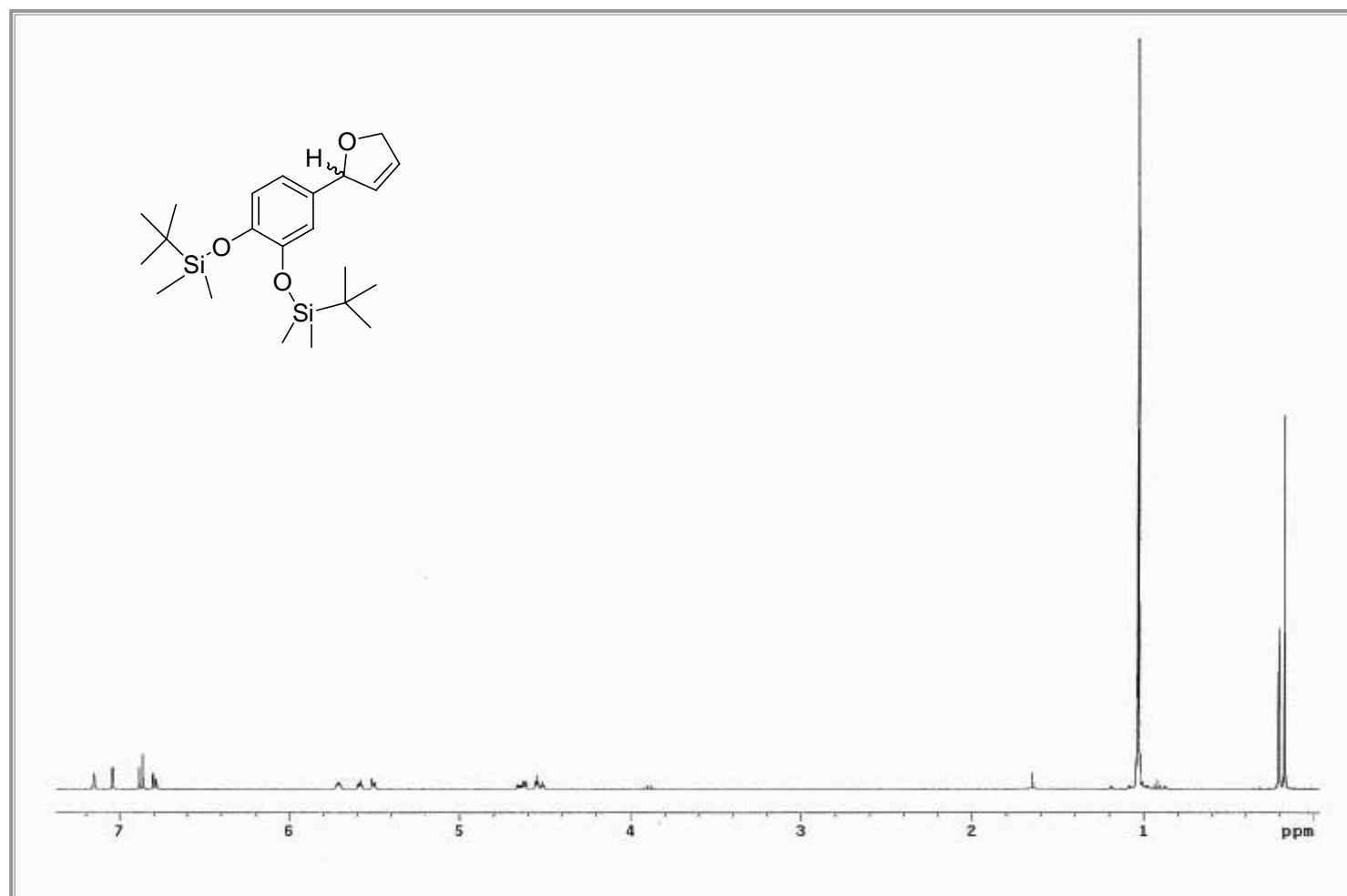
RMN de ^{13}C de 1-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)prop-2-en-1-ol (**10**).



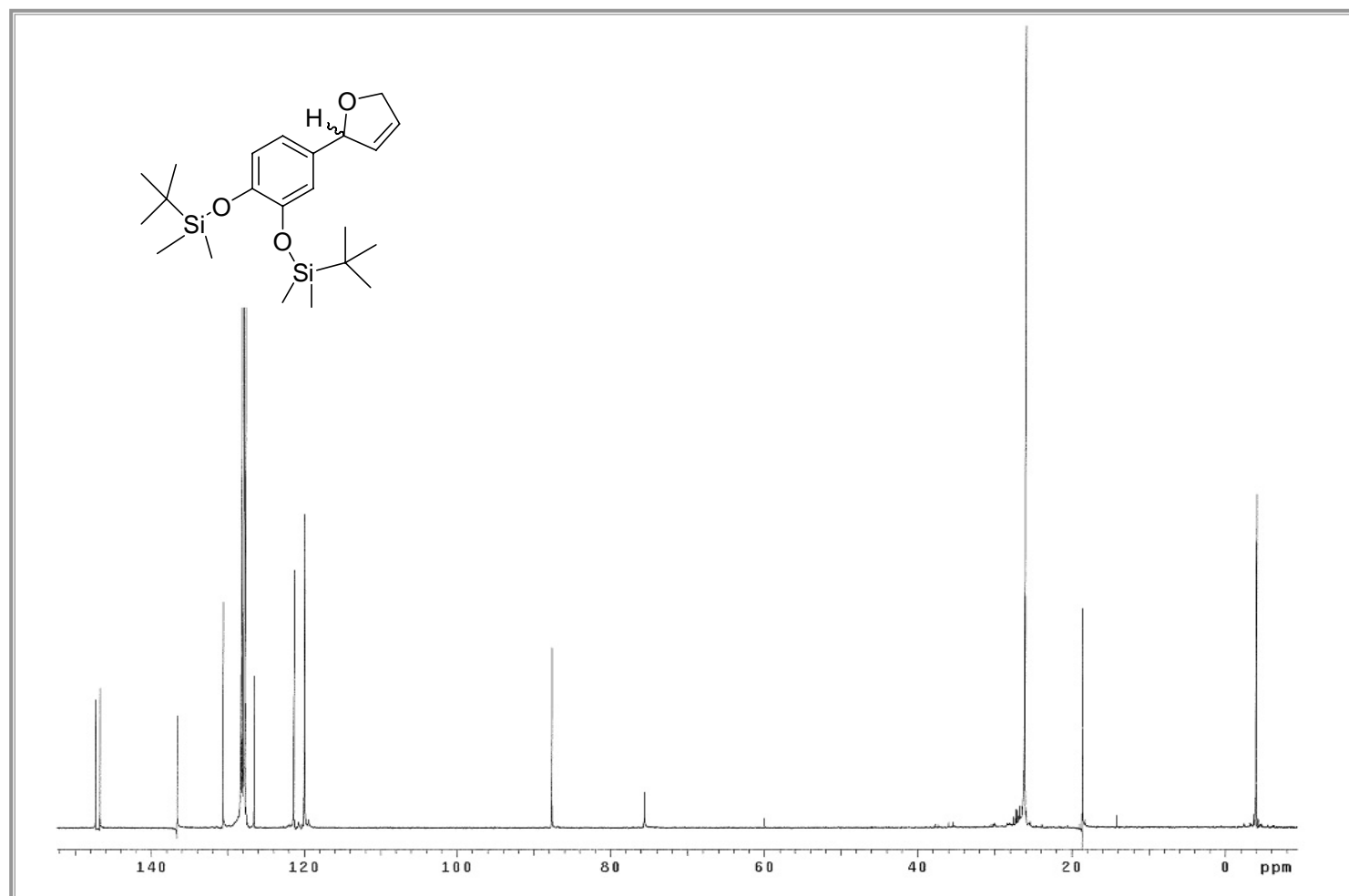
RMN de ^1H de 1-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldiméthylsilaniloxy)phényle)prop-2-en-1-yl] éther (**11**).



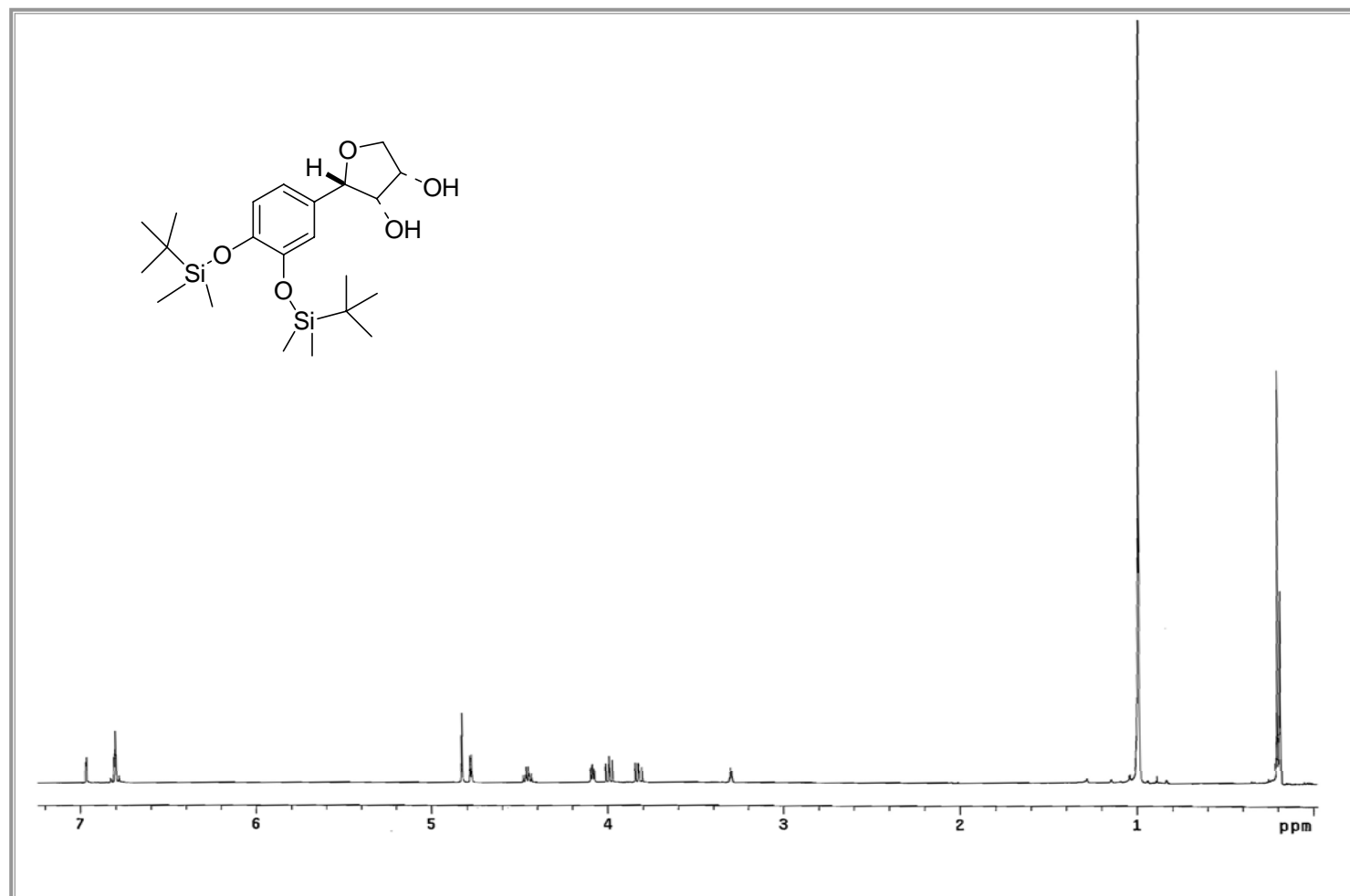
RMN de ^{13}C de 1-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldiméthylsilaniloxy)phényle)]prop-2-ényle éther (**11**).



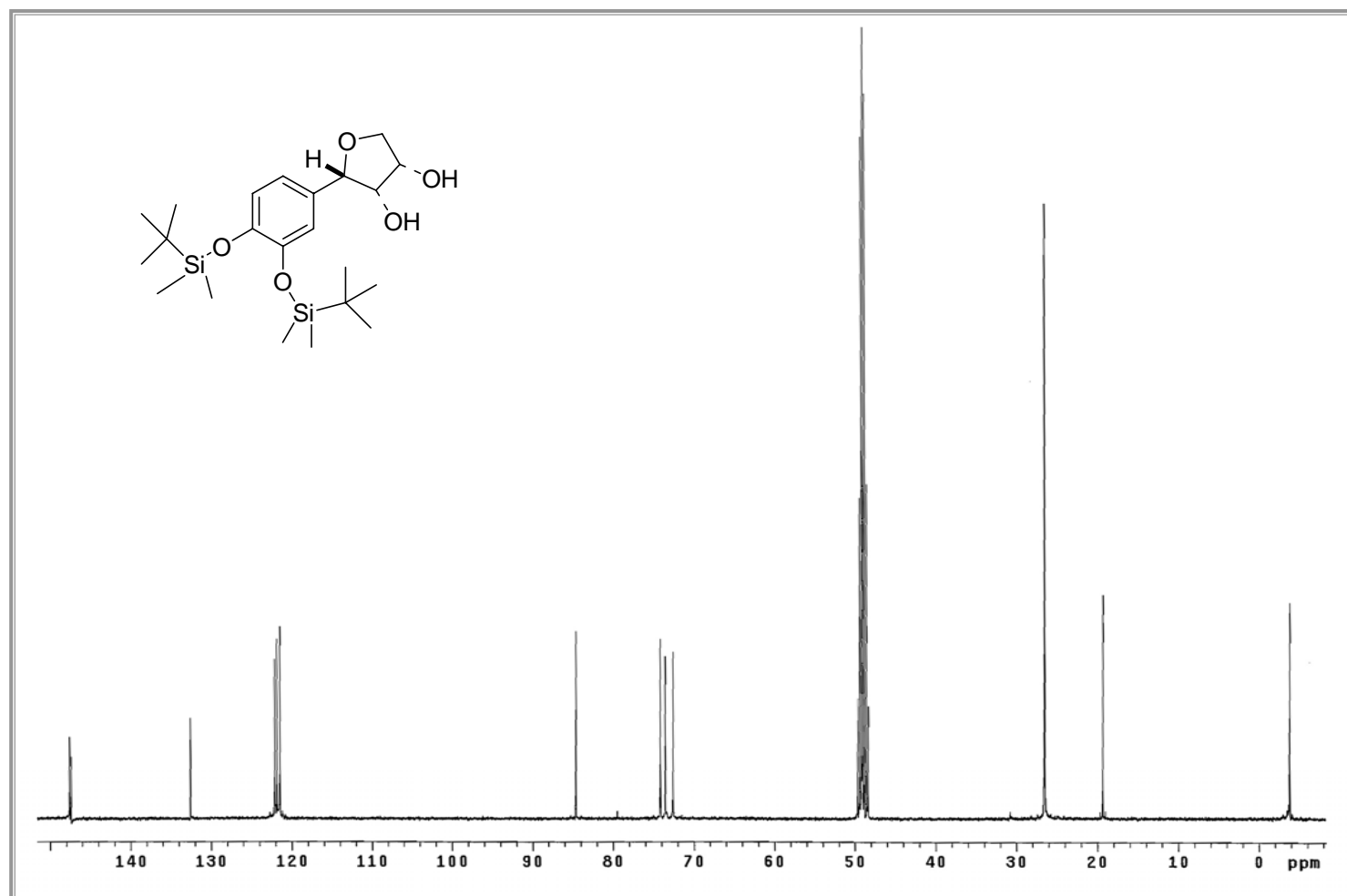
RMN de ^1H de 2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)fenil)]-2,5-dihidrofurano (**12**).



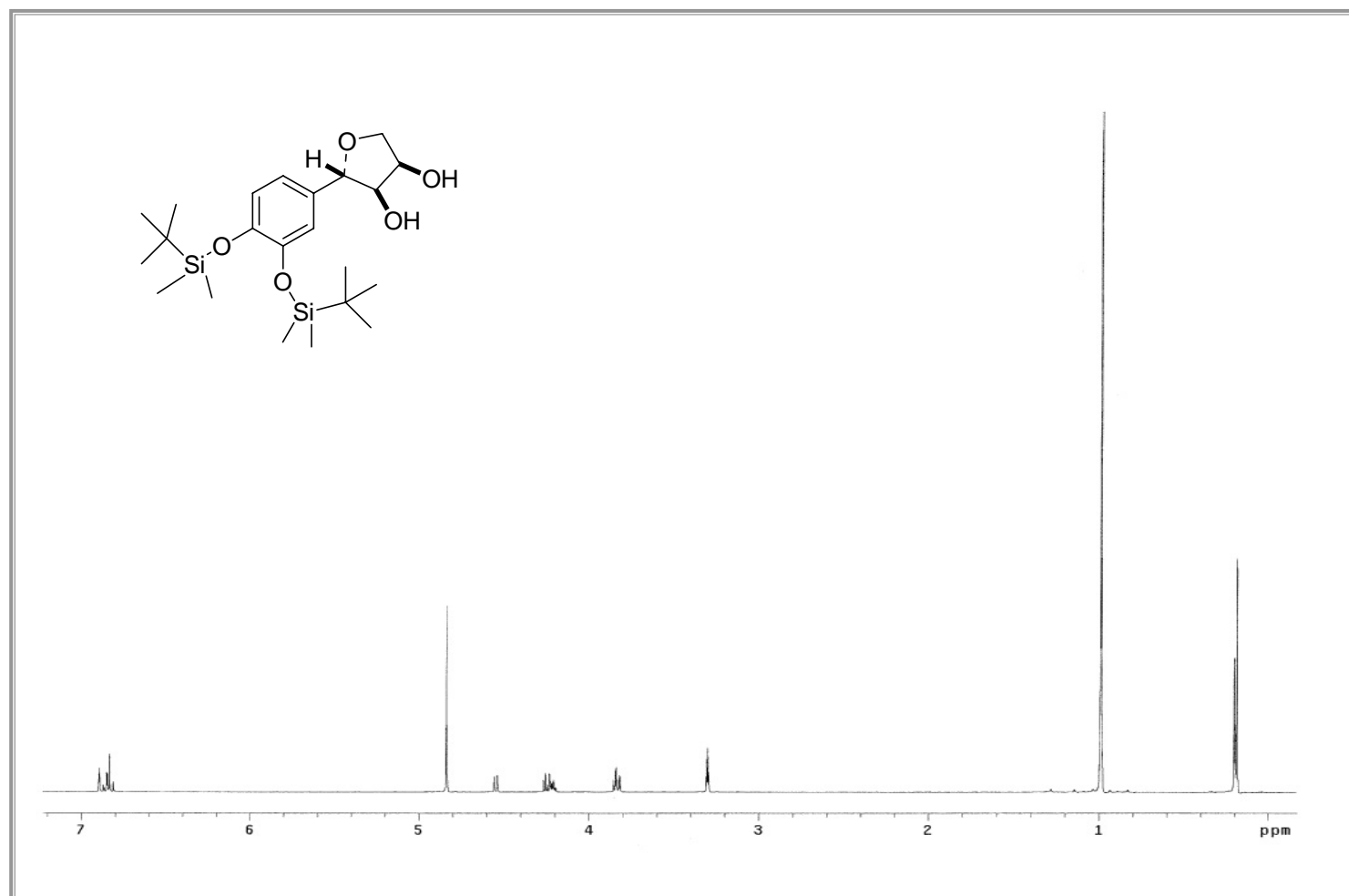
RMN de ^{13}C de 2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)fenil)]-2,5-dihidrofurano (**12**).



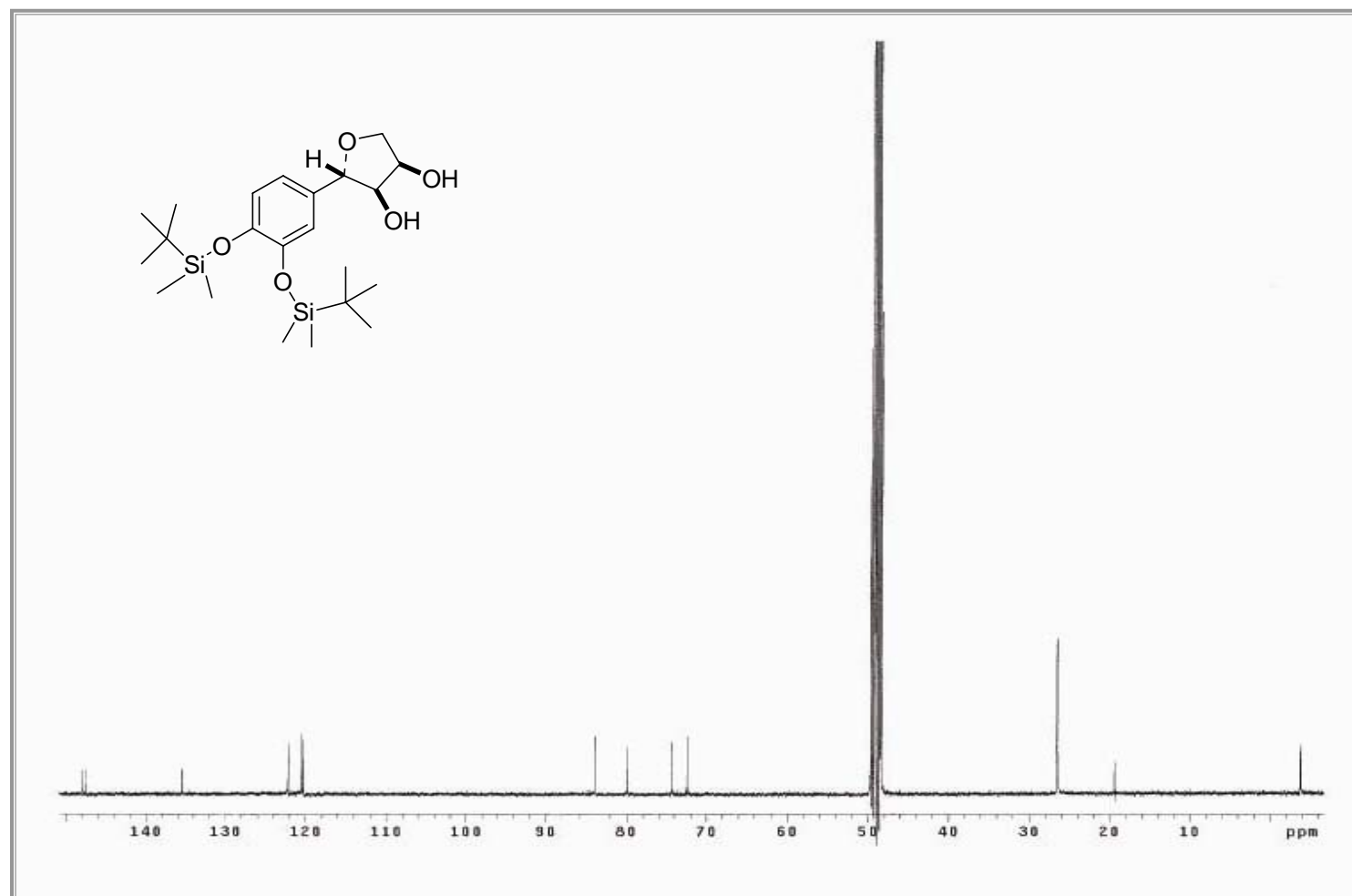
RMN de ¹H de (2S(R),3R(S),4S(R))-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)tetrahydrofuran-3,4-diol ((±)-**13a**).



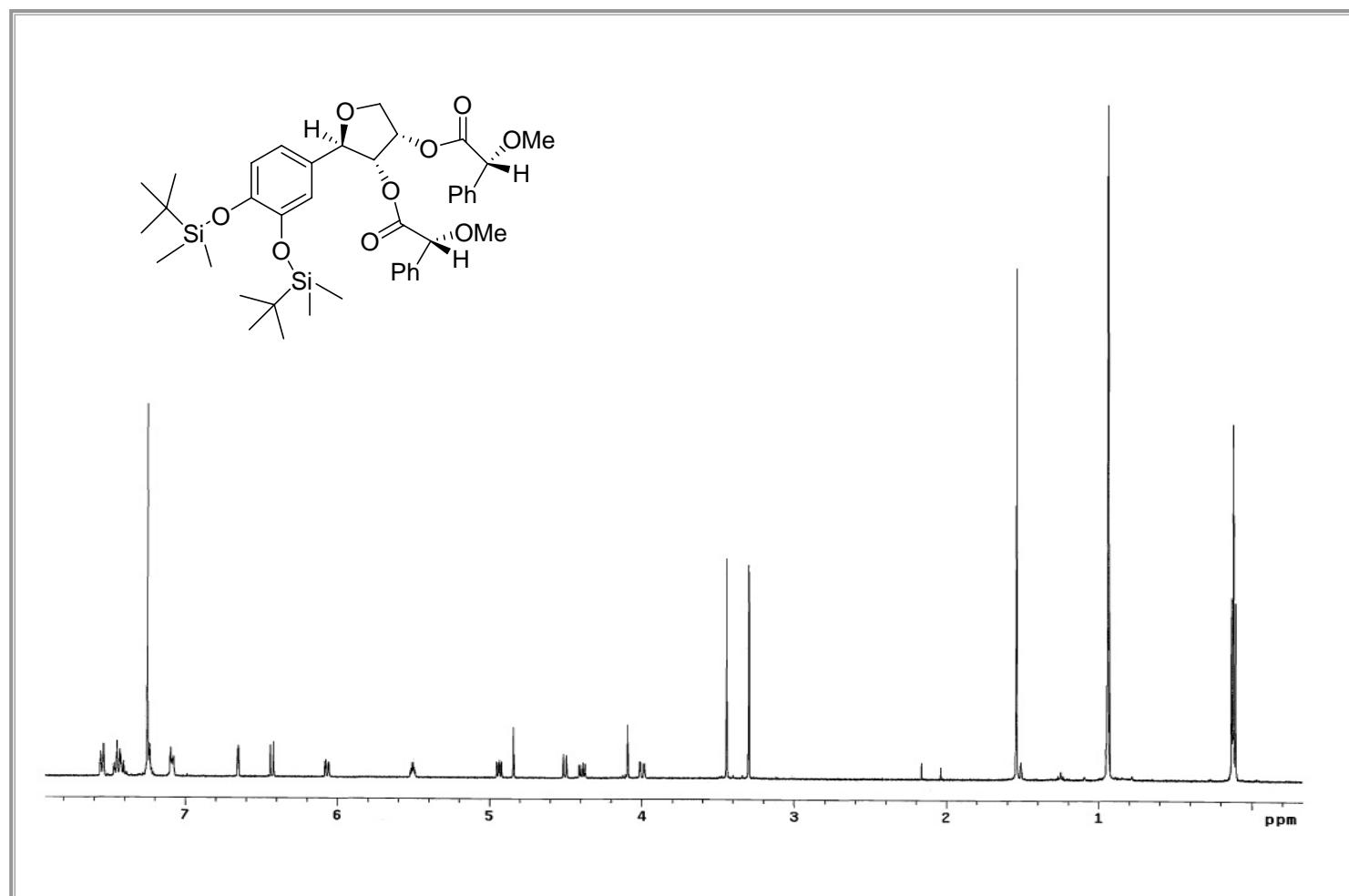
RMN de ^{13}C de $(2S(R),3R(S),4S(R))$ -2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)fenil)]tetrahydrofurano-3,4-diol ((\pm)-**13a**).



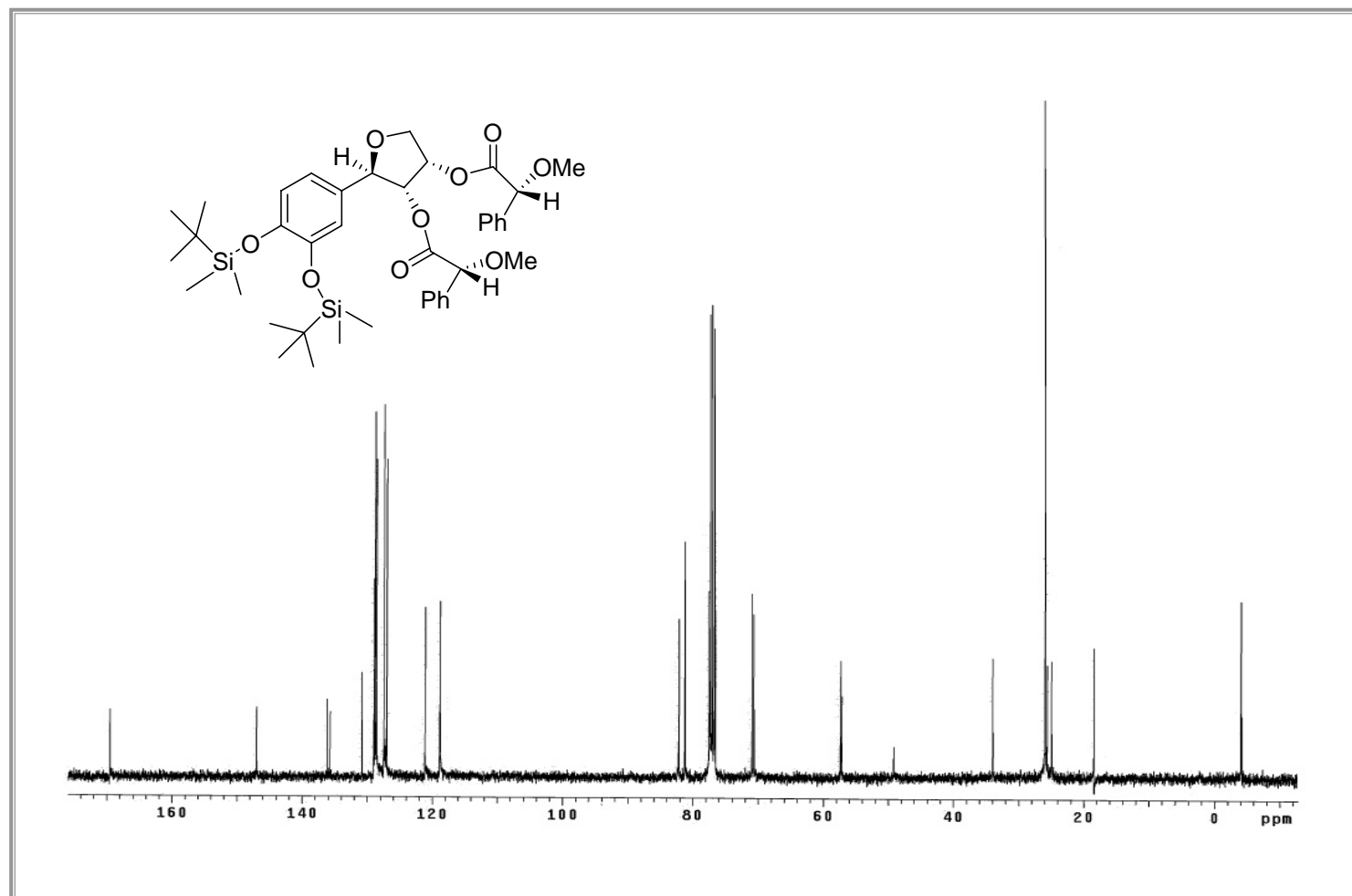
RMN de ¹H de (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)]tetrahydrofuran-3,4-diol ((±)-**13b**).



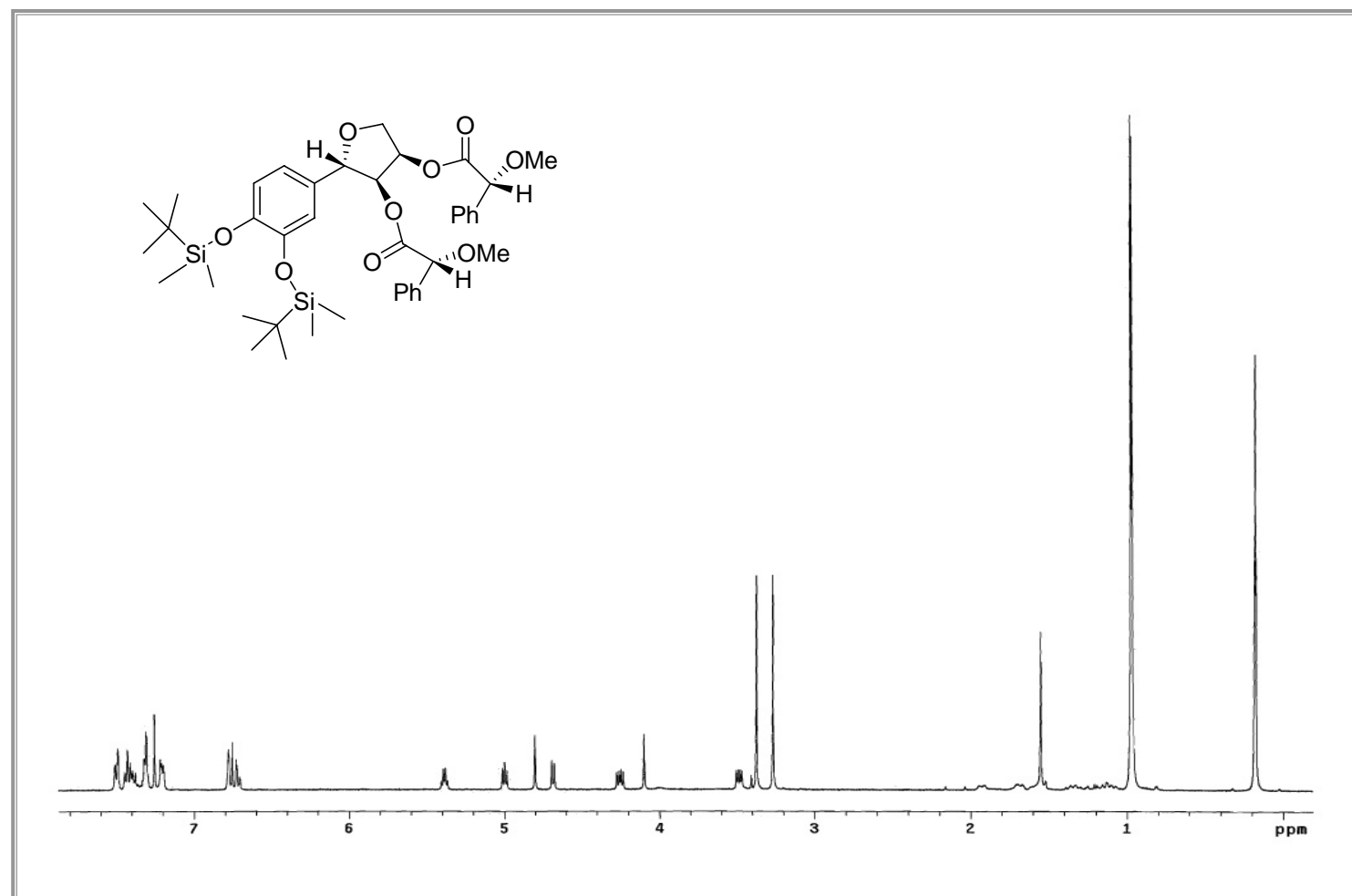
RMN de ^{13}C de (2*S*(*R*),3*S*(*R*),4*R*(*S*))-2-[(3',4'-bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)fenil)]tetrahidrofurano-3,4-diol ((±)-**13b**).



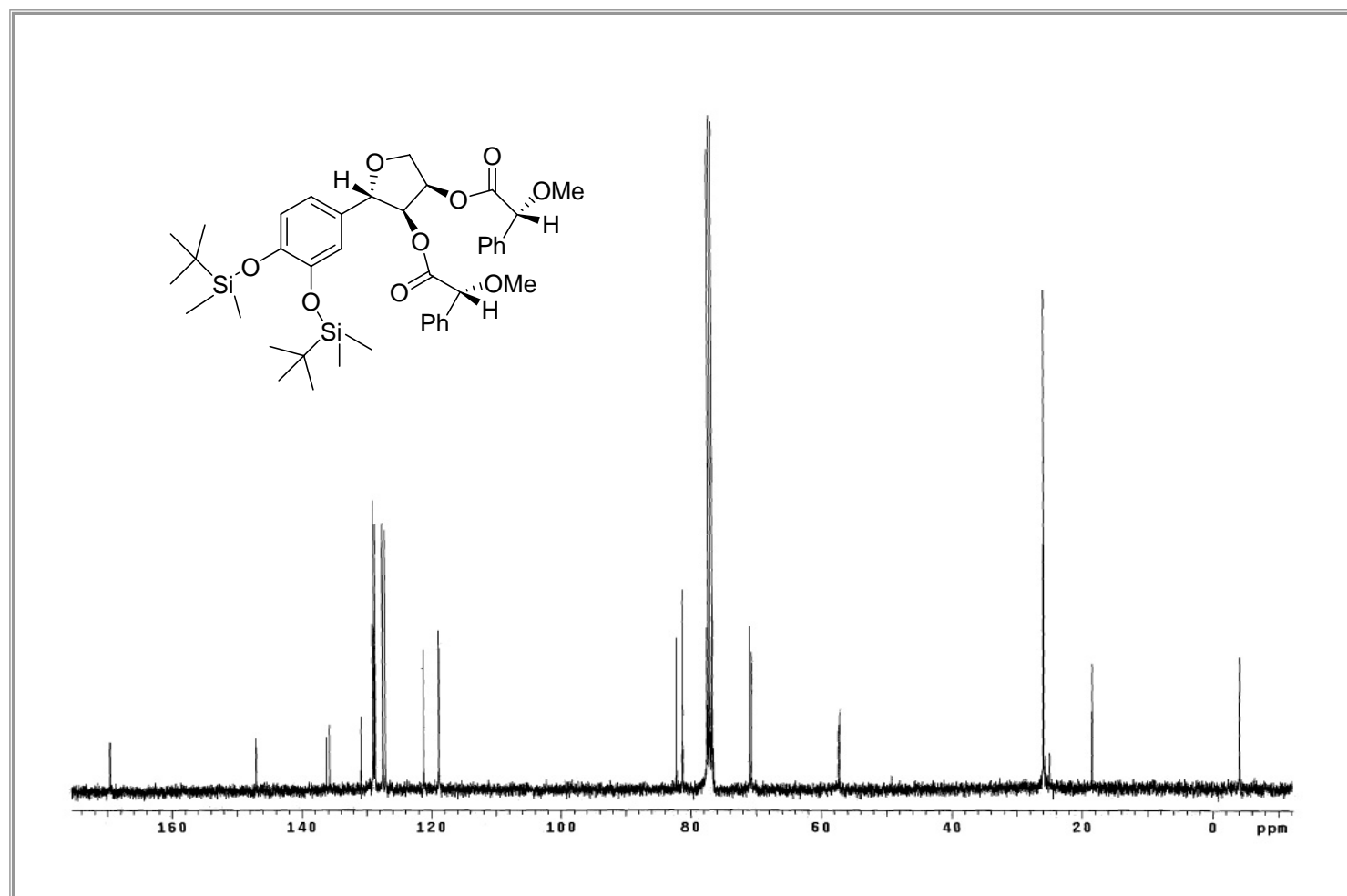
RMN de ¹H del compuesto (-)-14b.



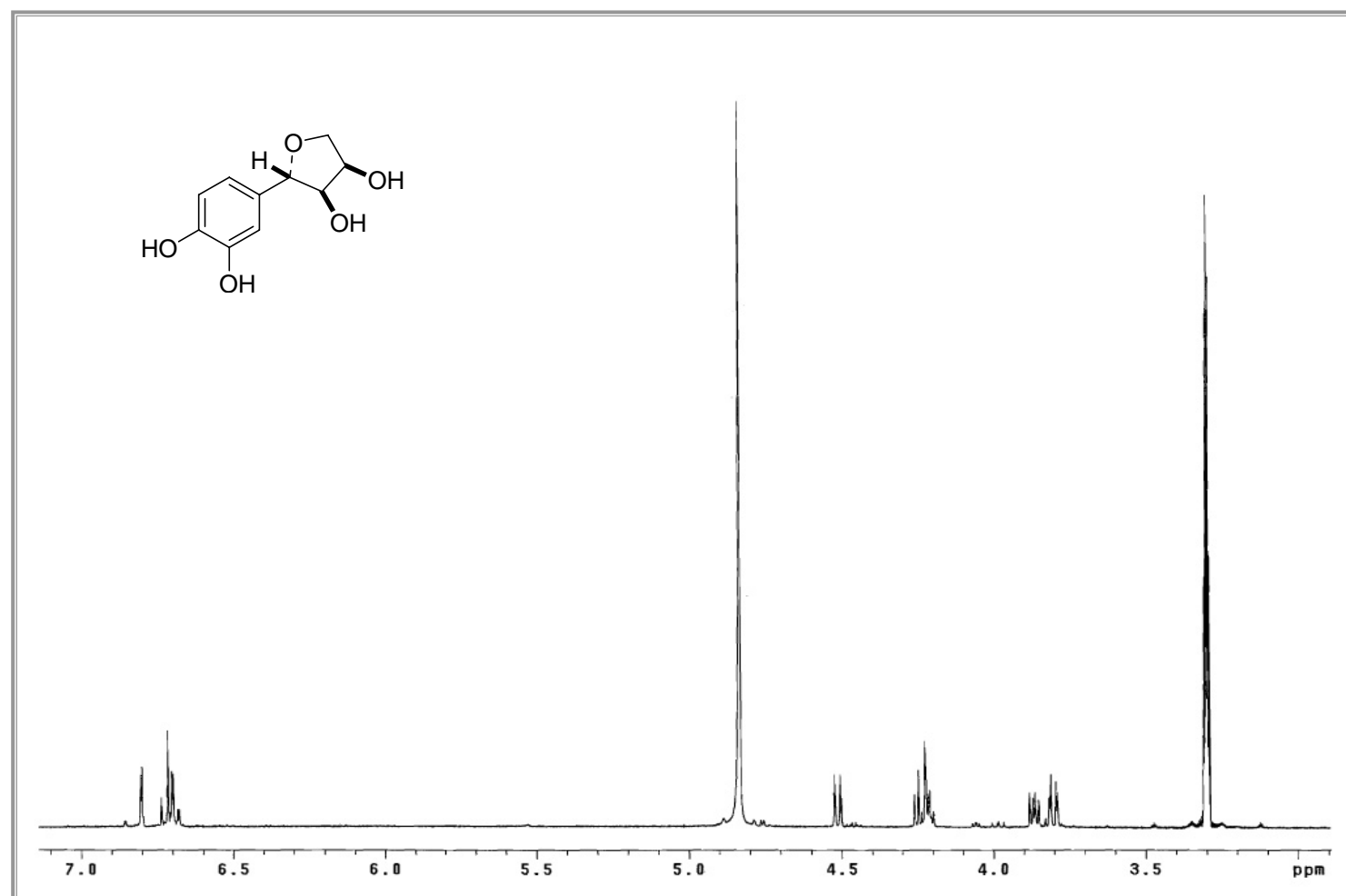
RMN de ^{13}C del compuesto (-)-14b.



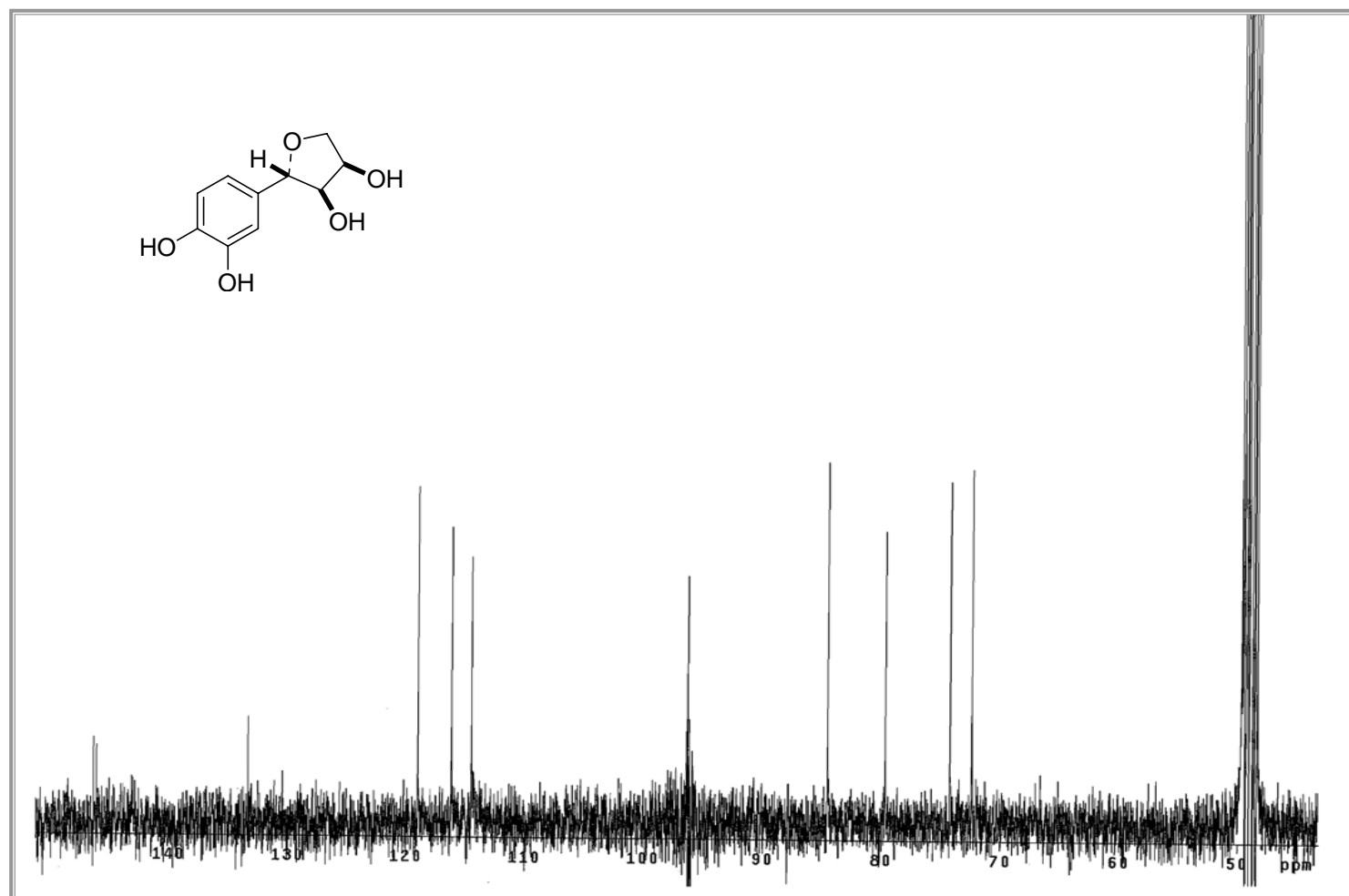
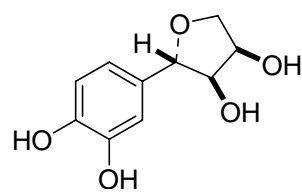
RMN de ¹H del compuesto (+)-15b.



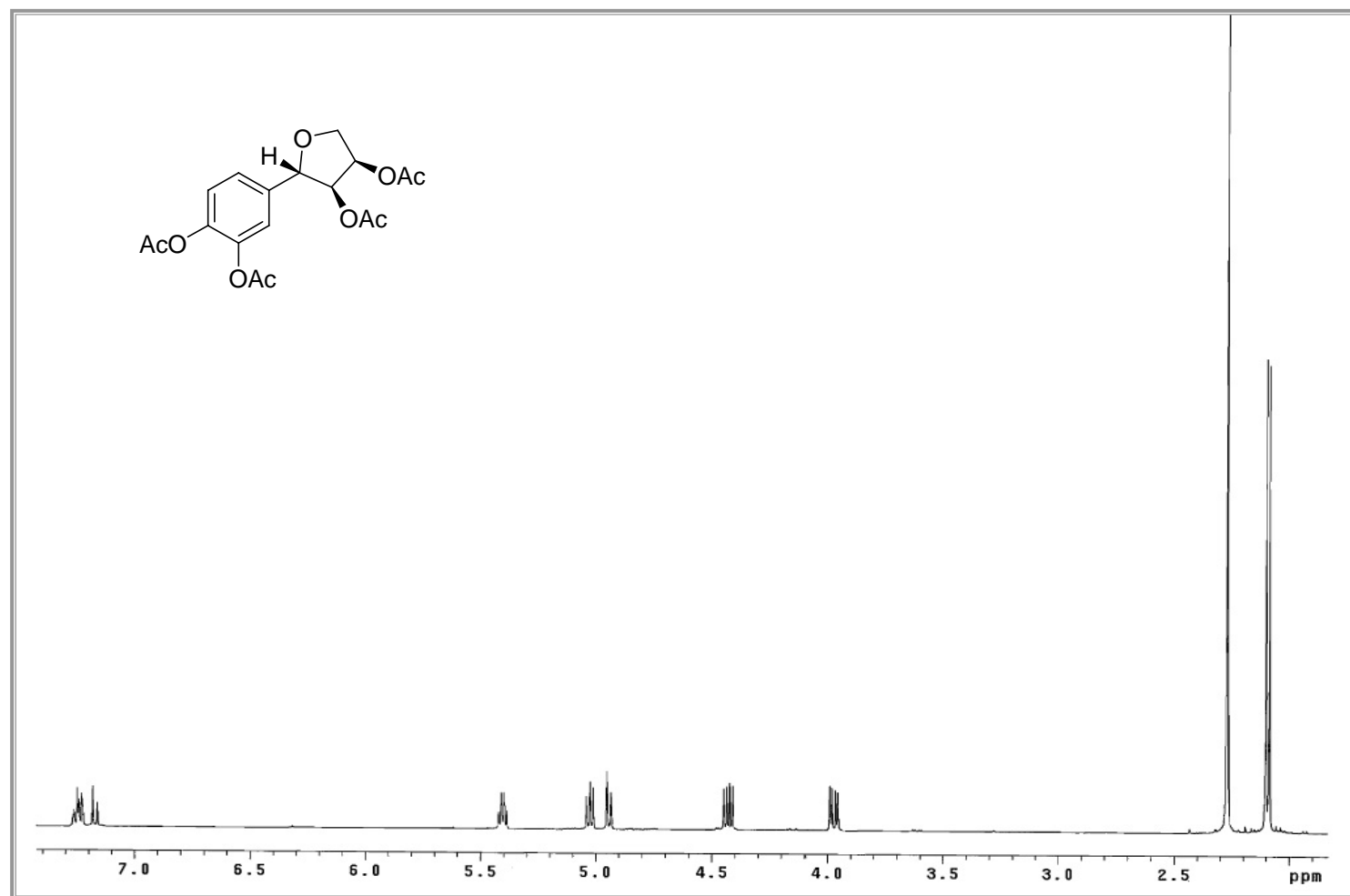
RMN de ^{13}C del compuesto (+)-15b.



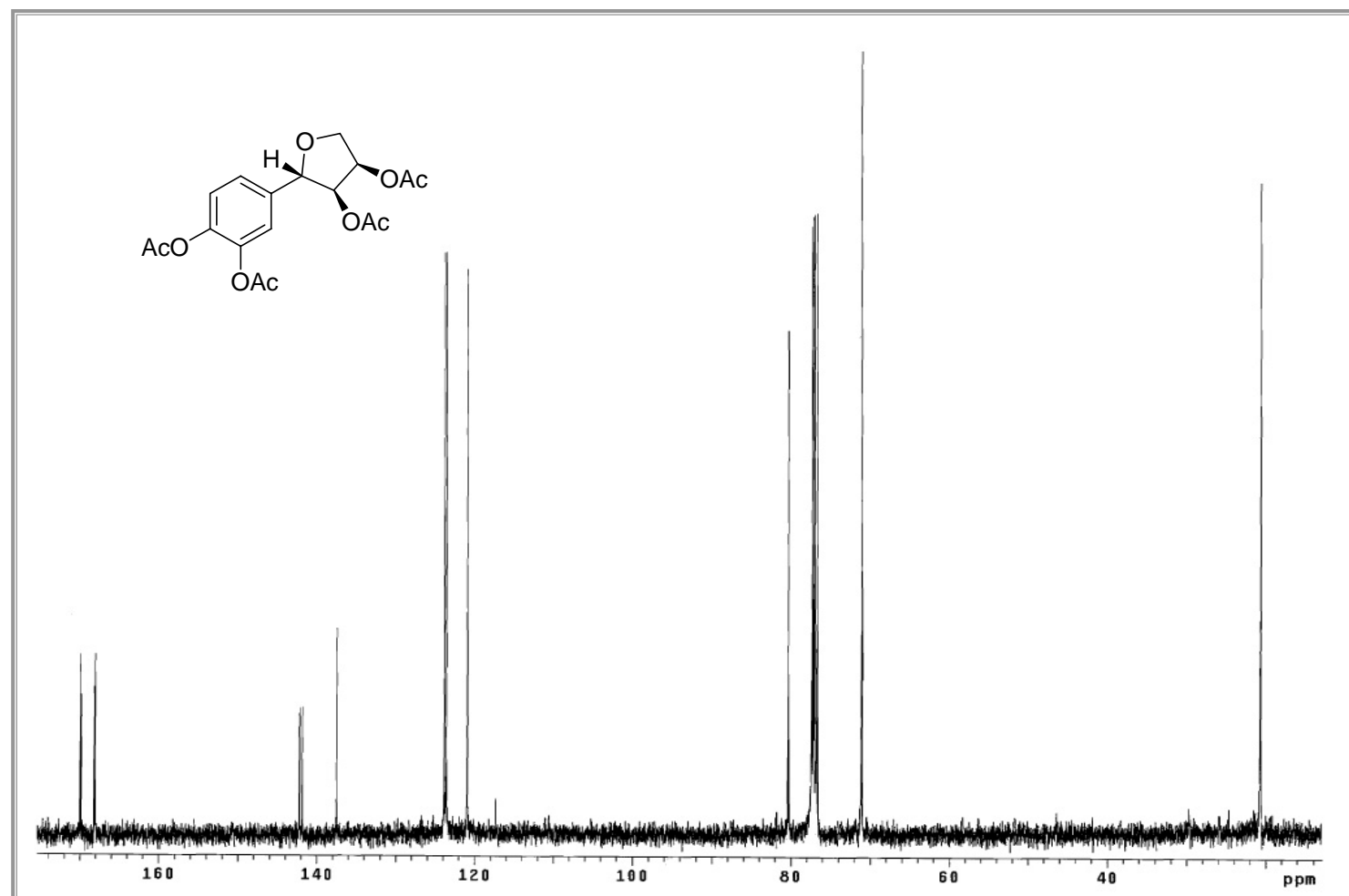
RMN de ^1H de (±)-gloeosporiol ((±)-I).



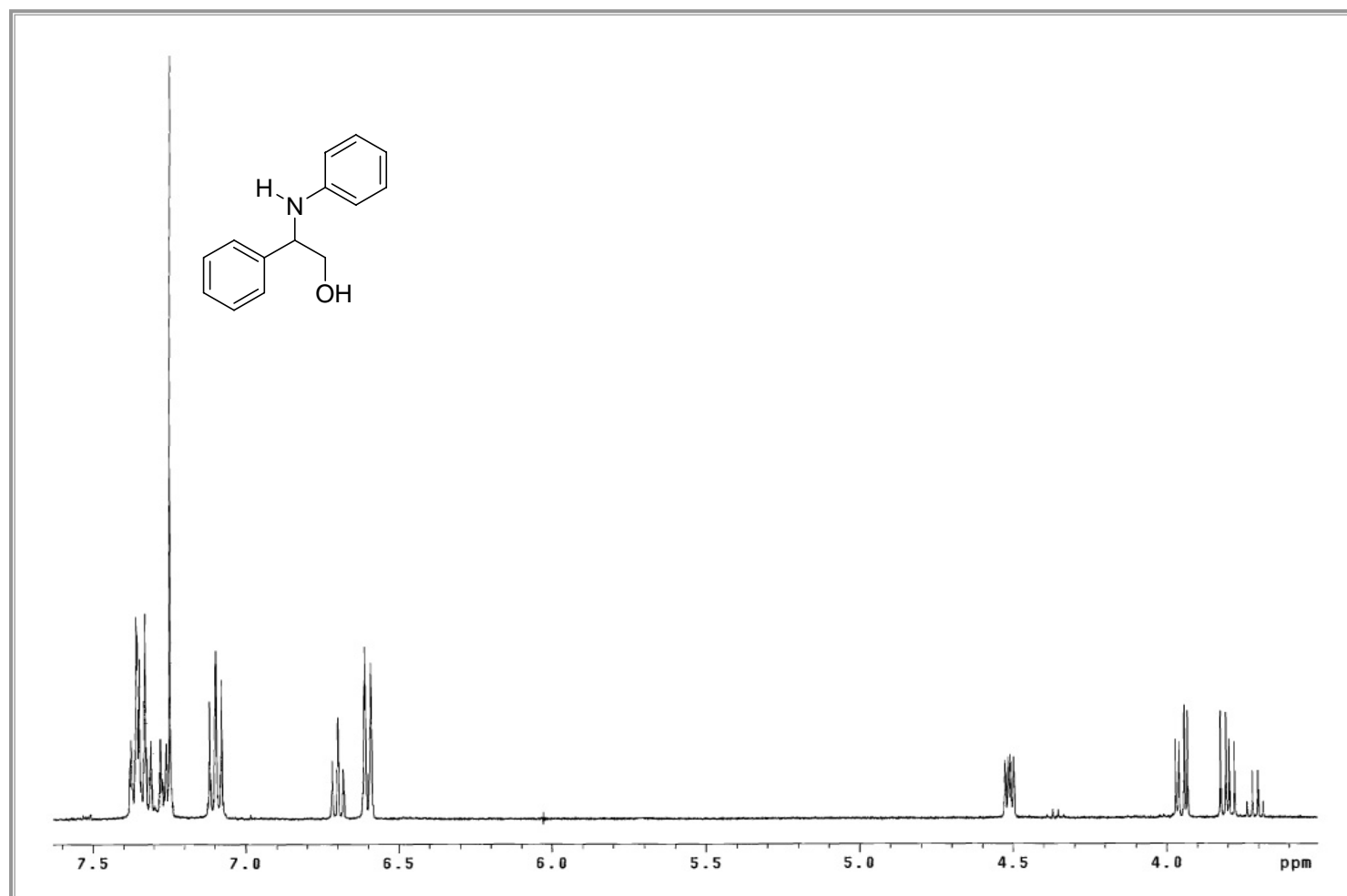
RMN de ^{13}C de (±)-gloeosporiol ((±)-I).



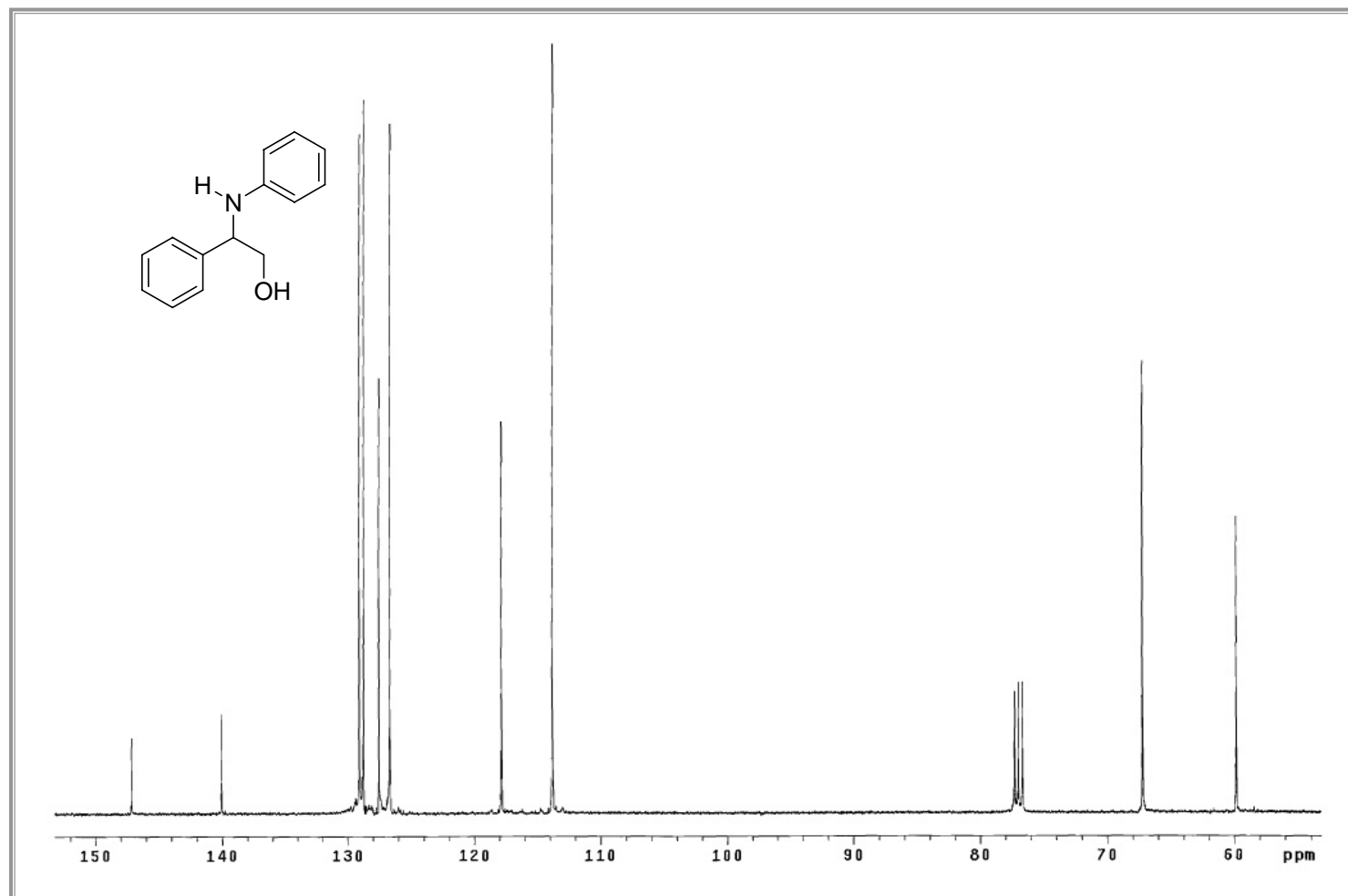
RMN de ¹H de (2S,3S,4R)-2-(3',4'-diacetoxyfenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((±)-1a).



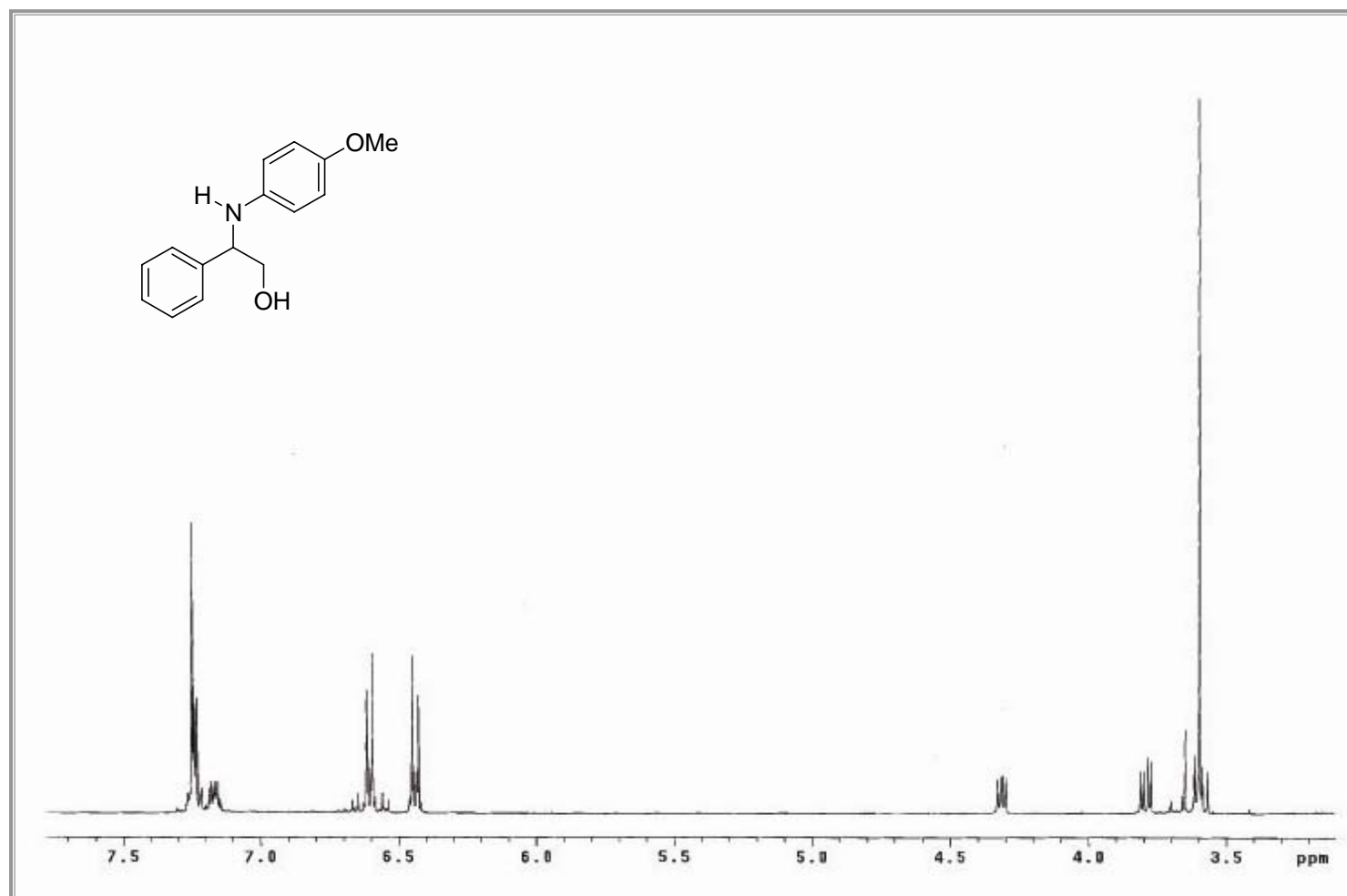
RMN de ^{13}C de $(2S,3S,4R)$ -2-(3',4'-diacetoxyfenil)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano ((\pm)-**1a**).



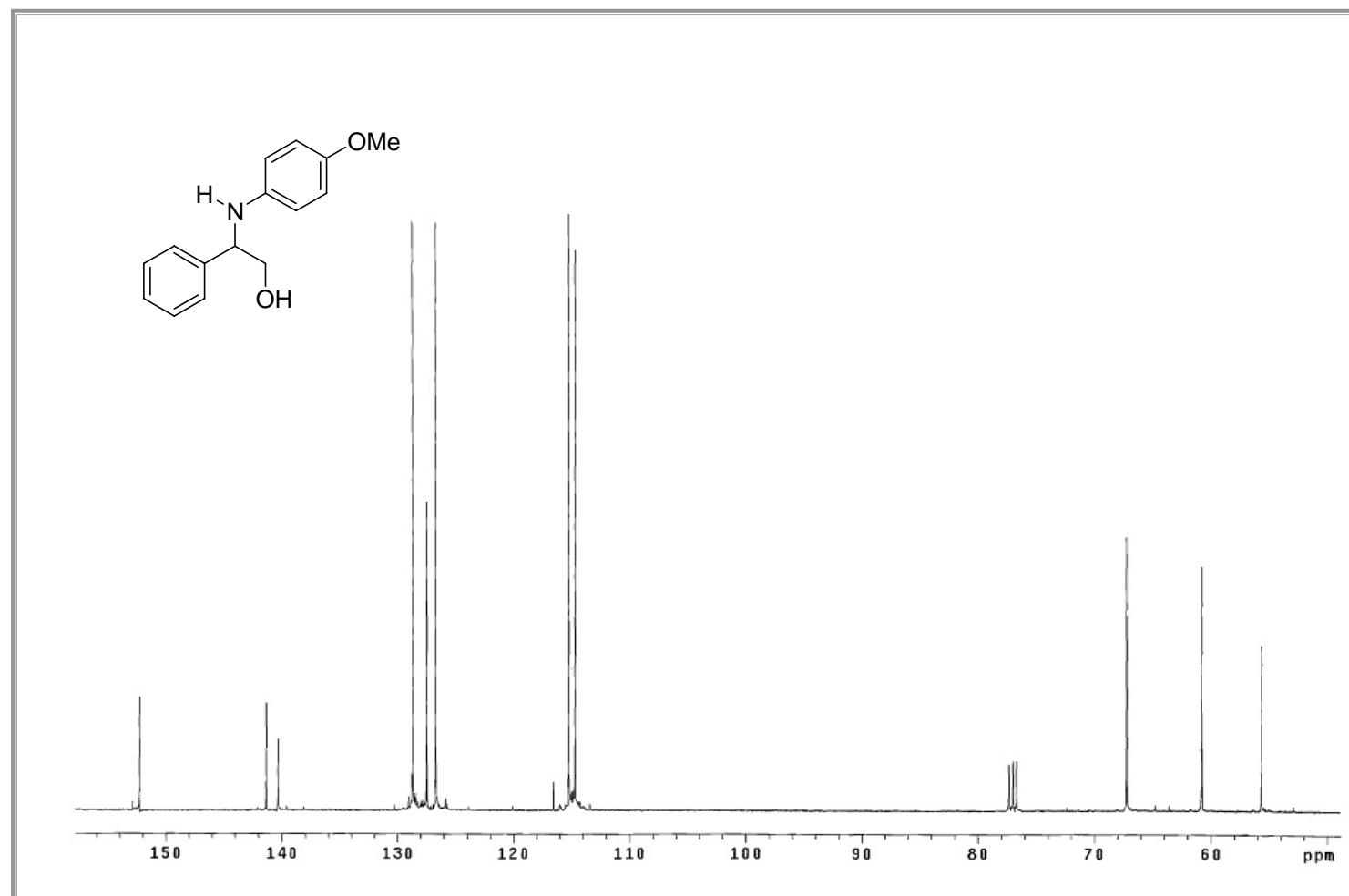
RMN de ^1H de 2-(fenilamina)-2-feniletanol (**18a**).



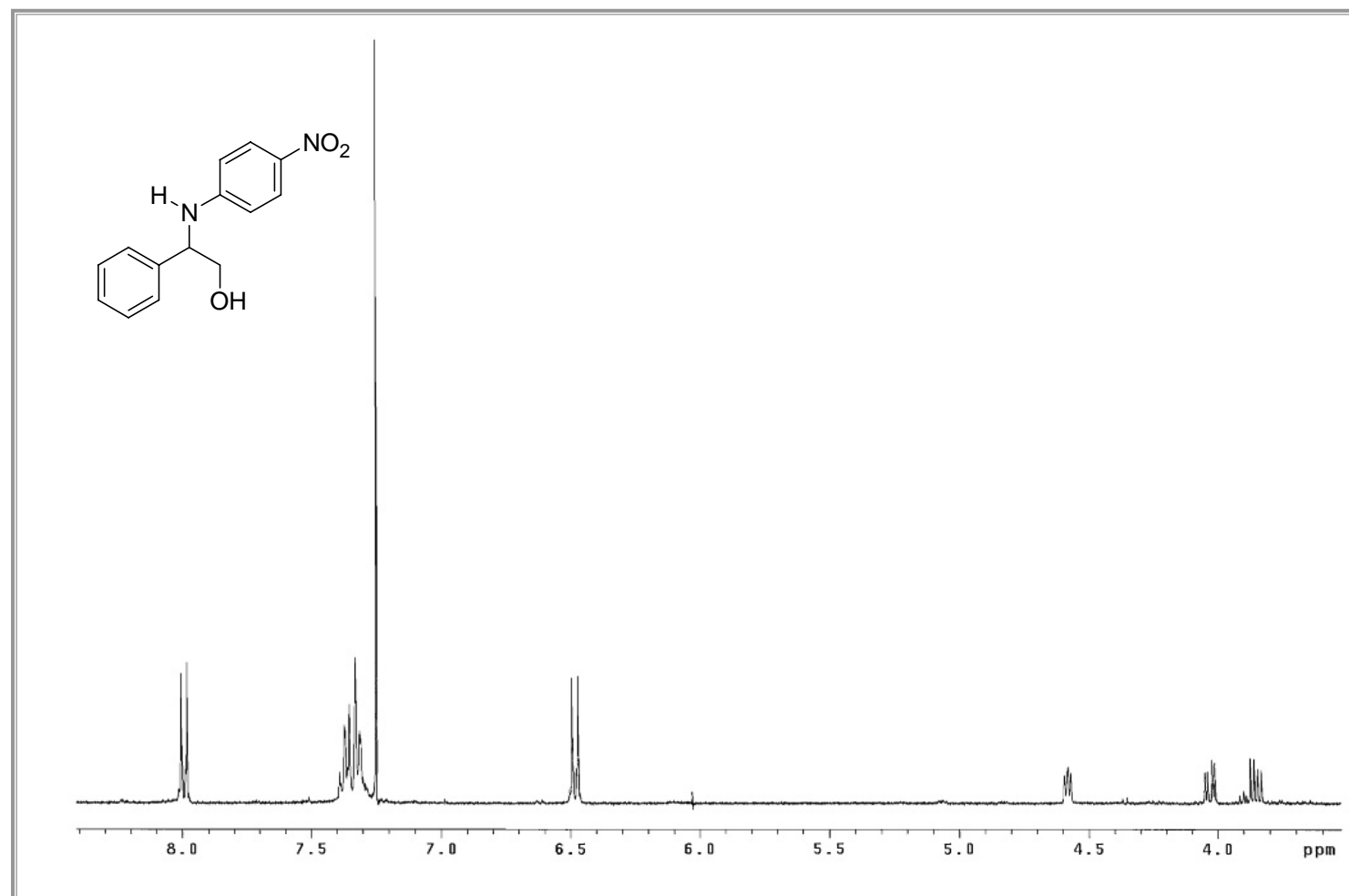
RMN de ^{13}C de 2-(fenilamina)-2-feniletanol (**18a**).



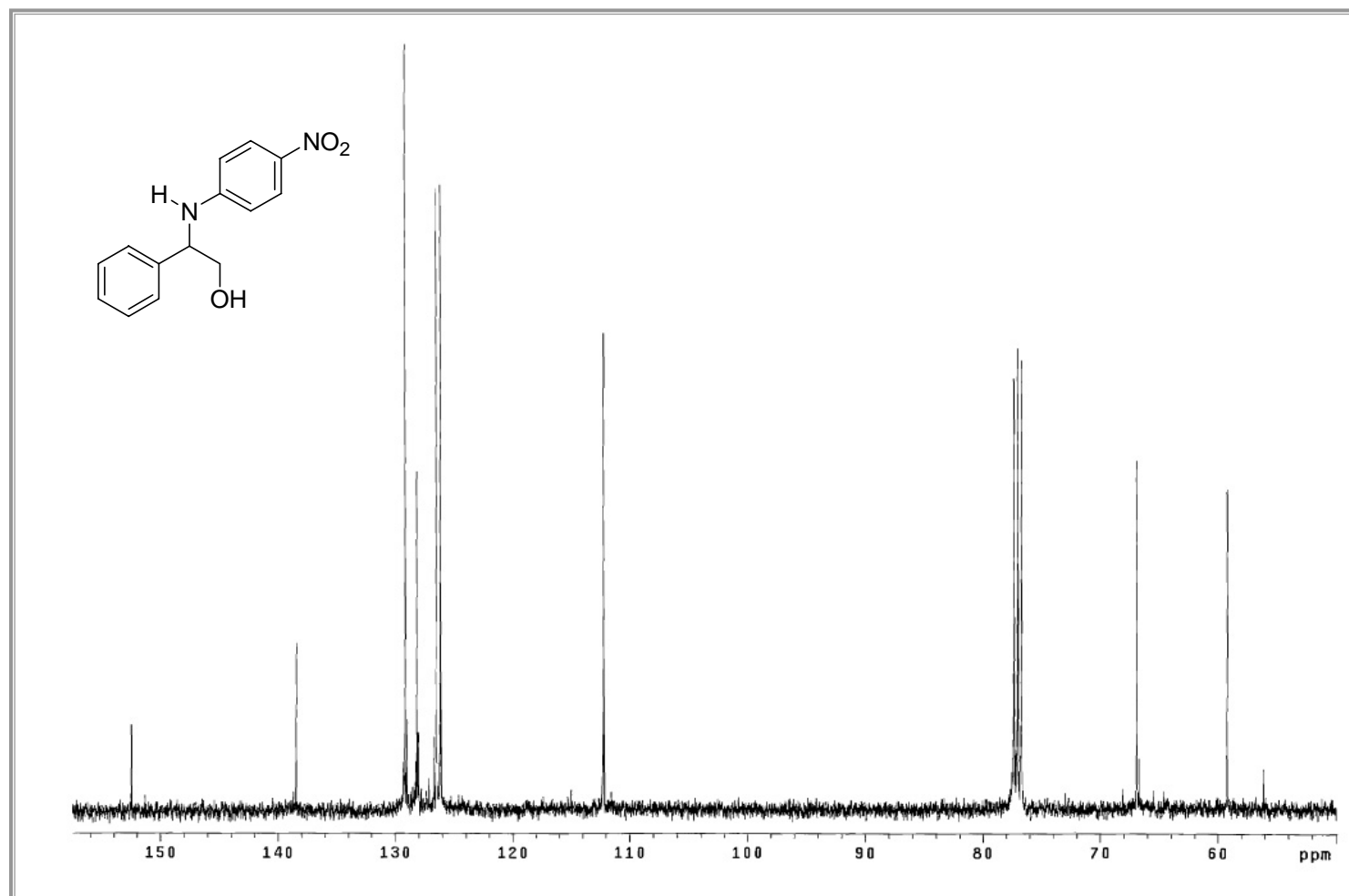
RMN de ^1H de 2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (**18b**).



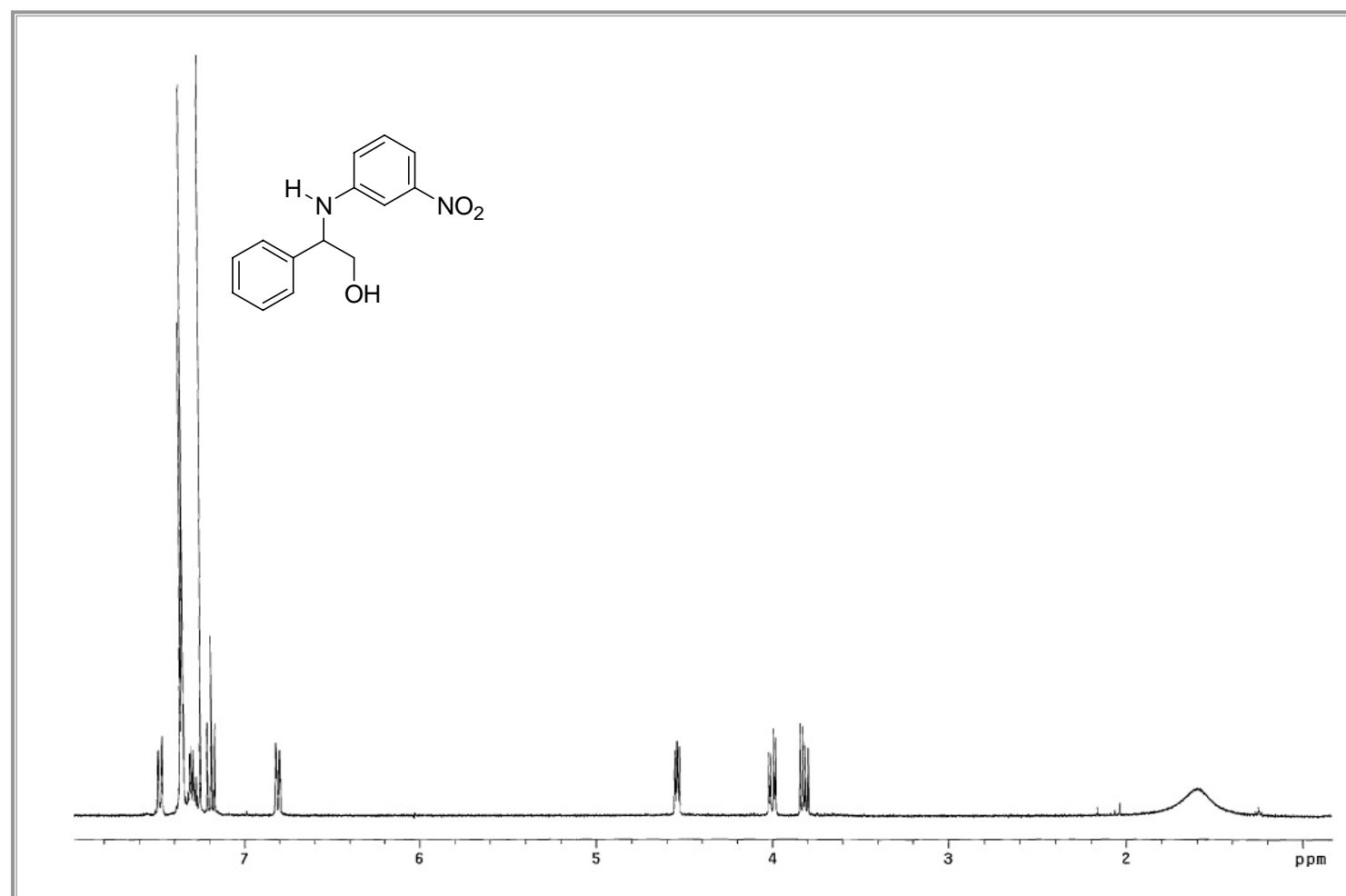
RMN de ^{13}C de 2-(4'-metoxifenilamino)-2-feniletanol (**18b**).



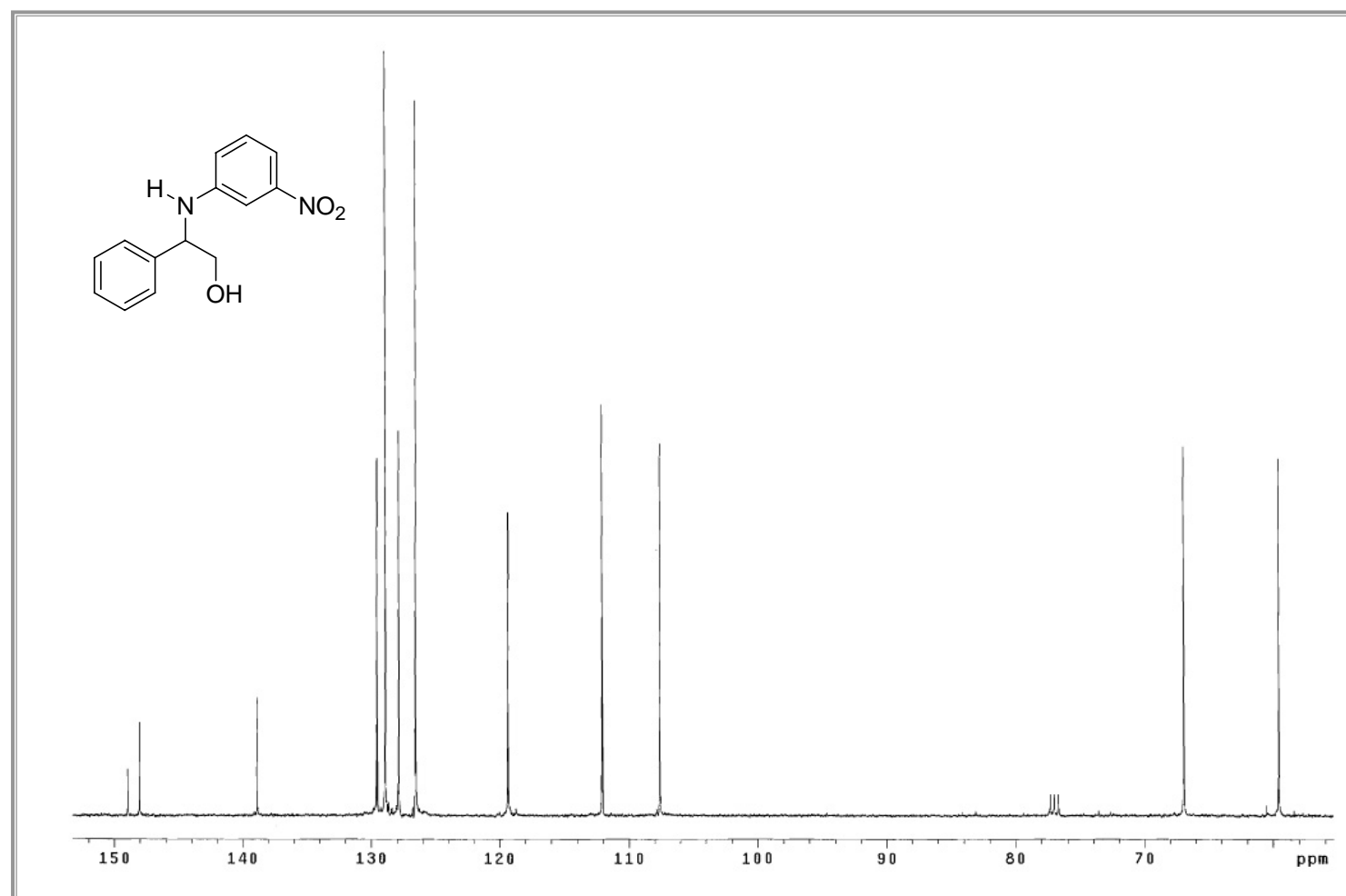
RMN de ¹H de 2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18c**).



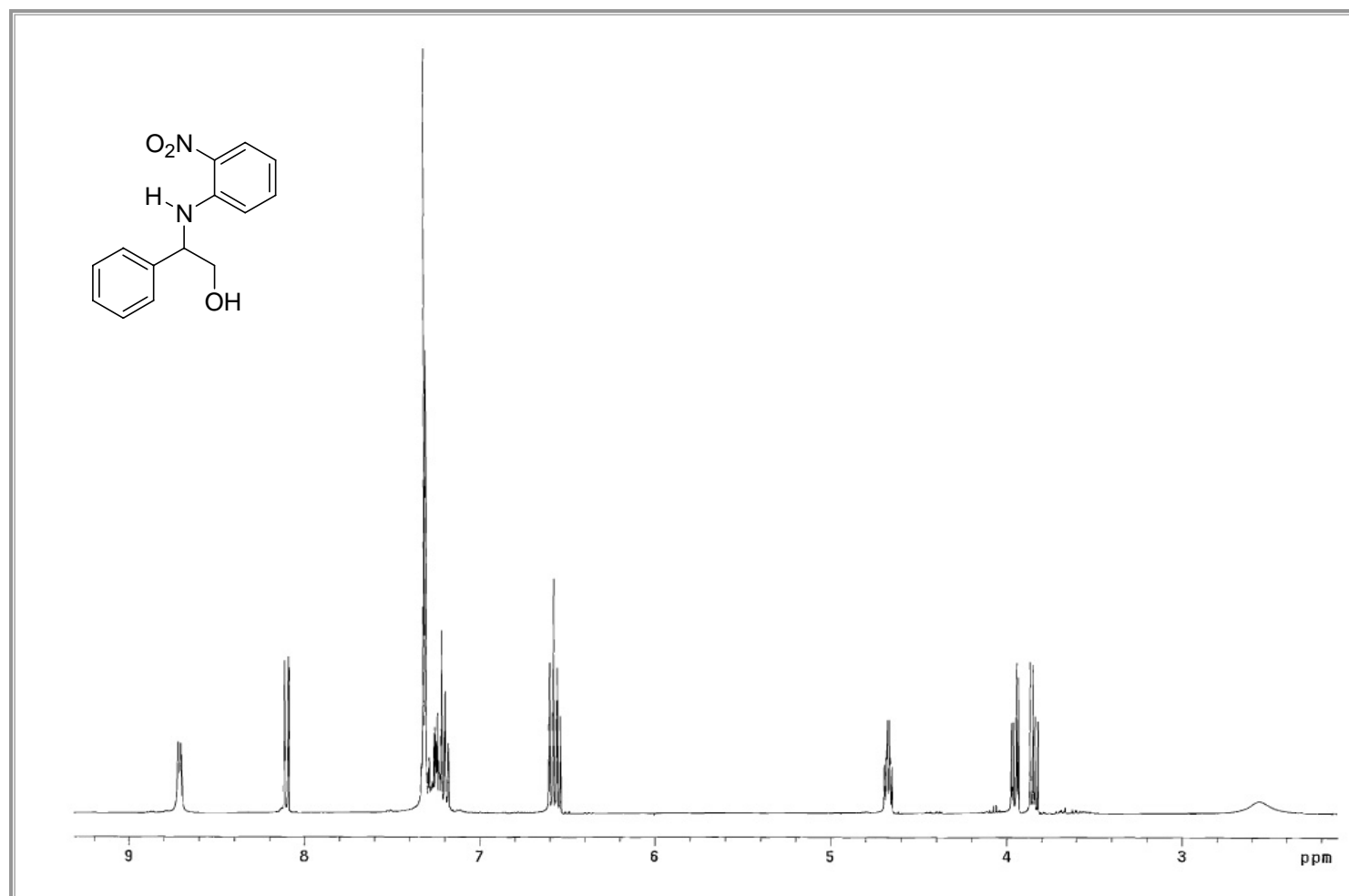
RMN de ^{13}C de 2-(4'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18c**).



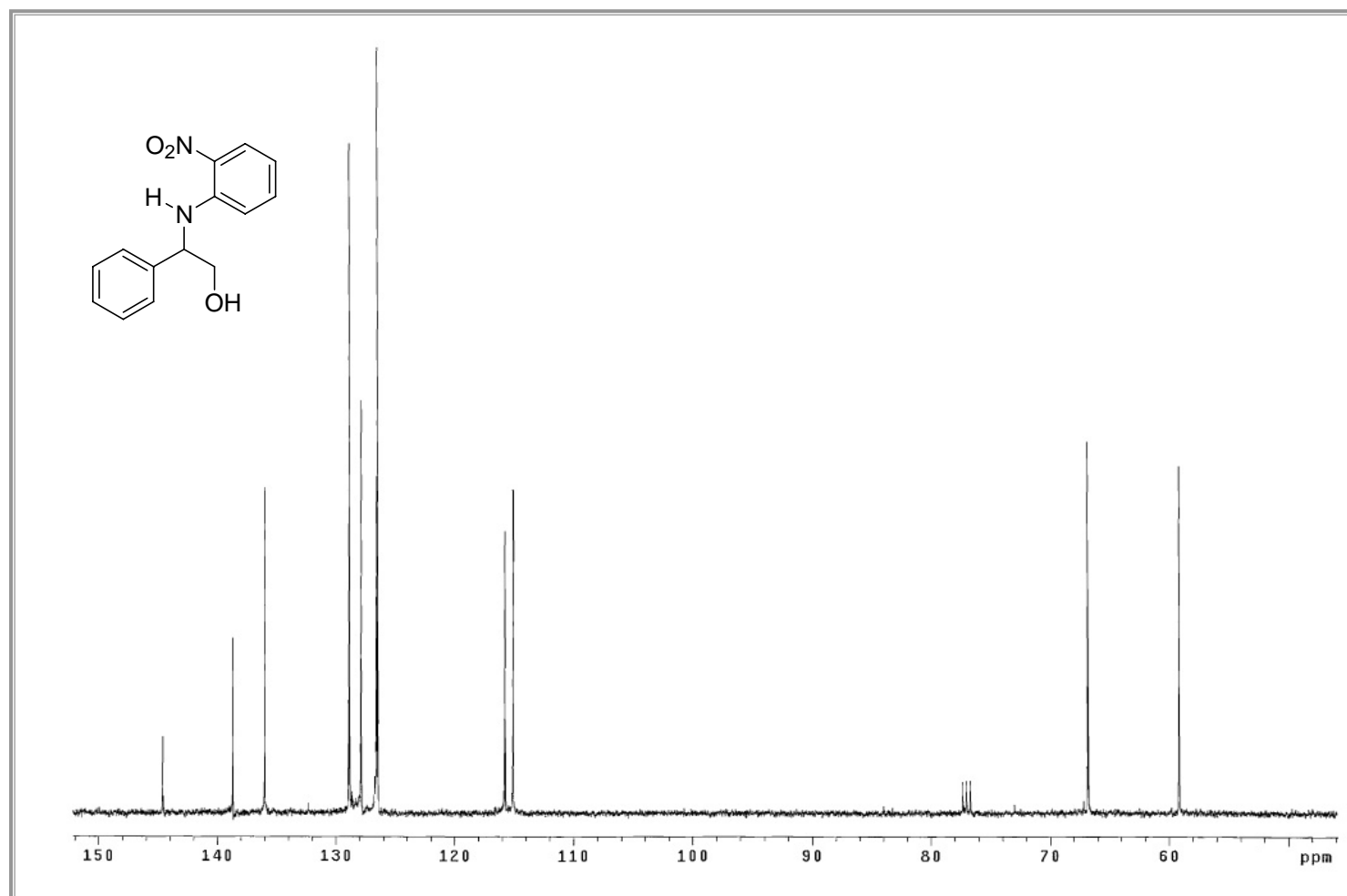
RMN de ^1H de 2-(3'-nitrophenilamino)-2-feniletanol (**18d**).



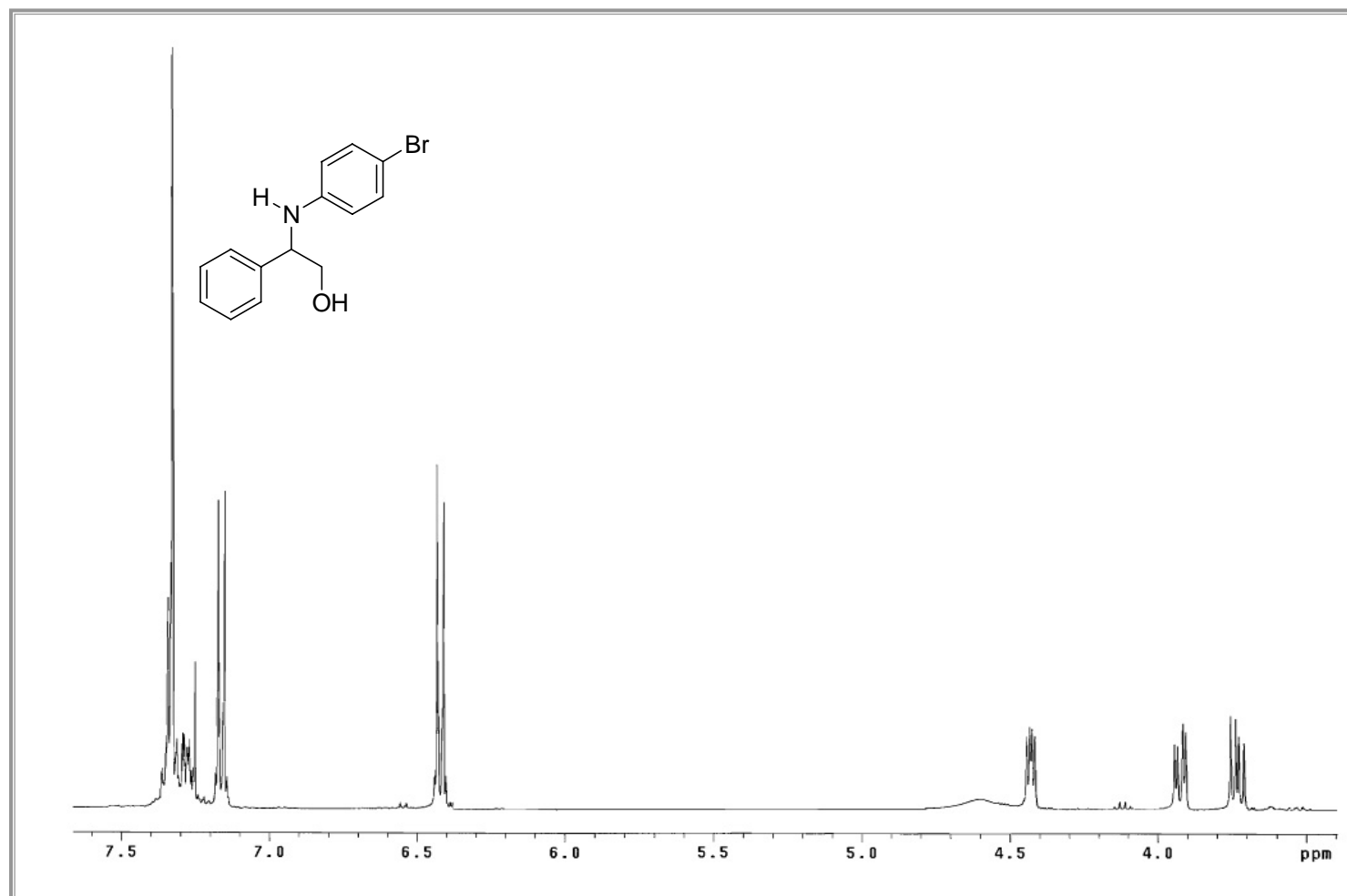
RMN de ¹³C de 2-(3'-nitrophenylamino)-2-feniletanol (**18d**).



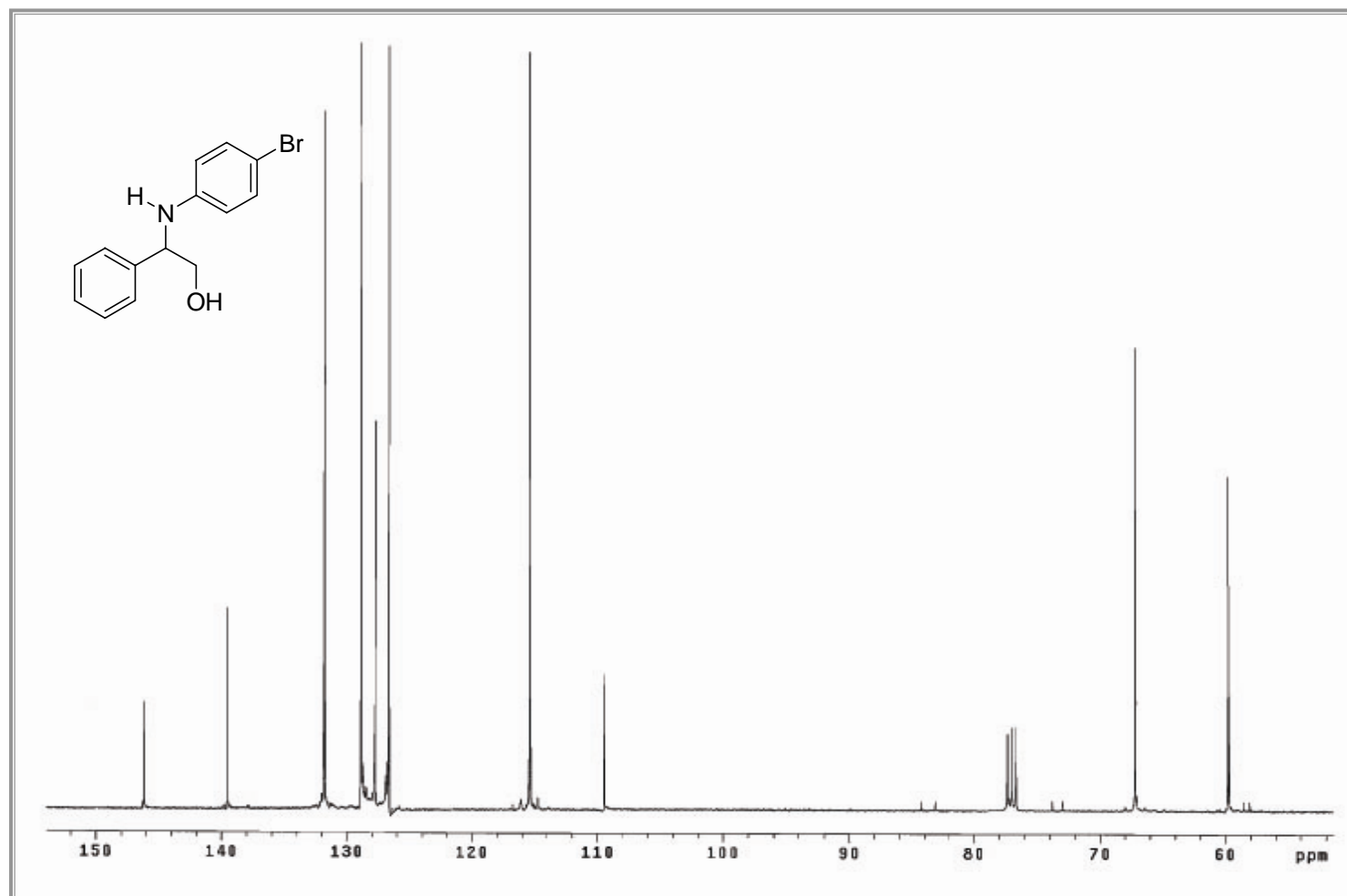
RMN de ^1H de 2-(2'-nitrofenilamino)-2-feniletanol (**18e**).



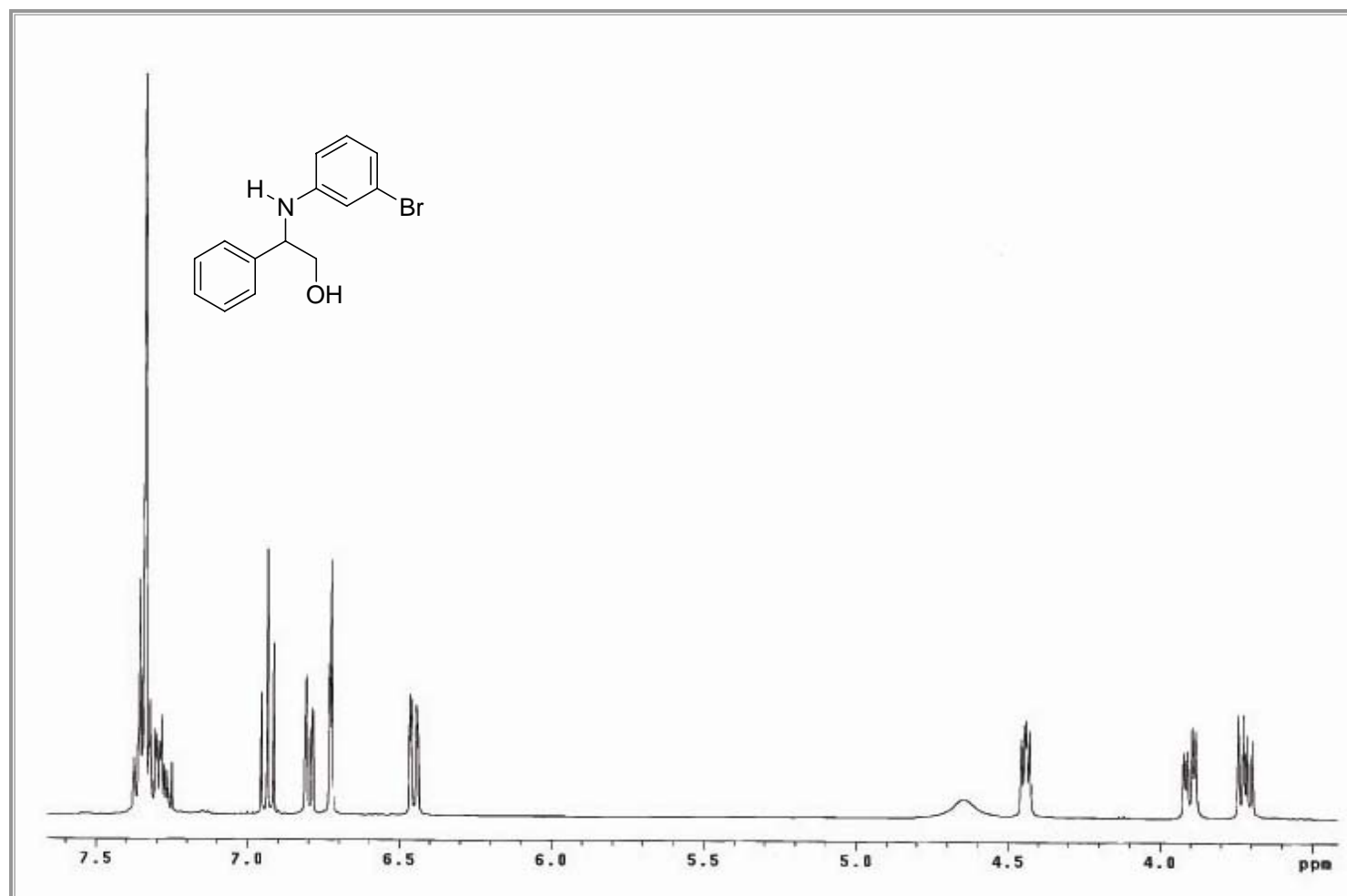
RMN de ¹³C de 2-(2'-nitrophenylamino)-2-feniletanol (**18e**).



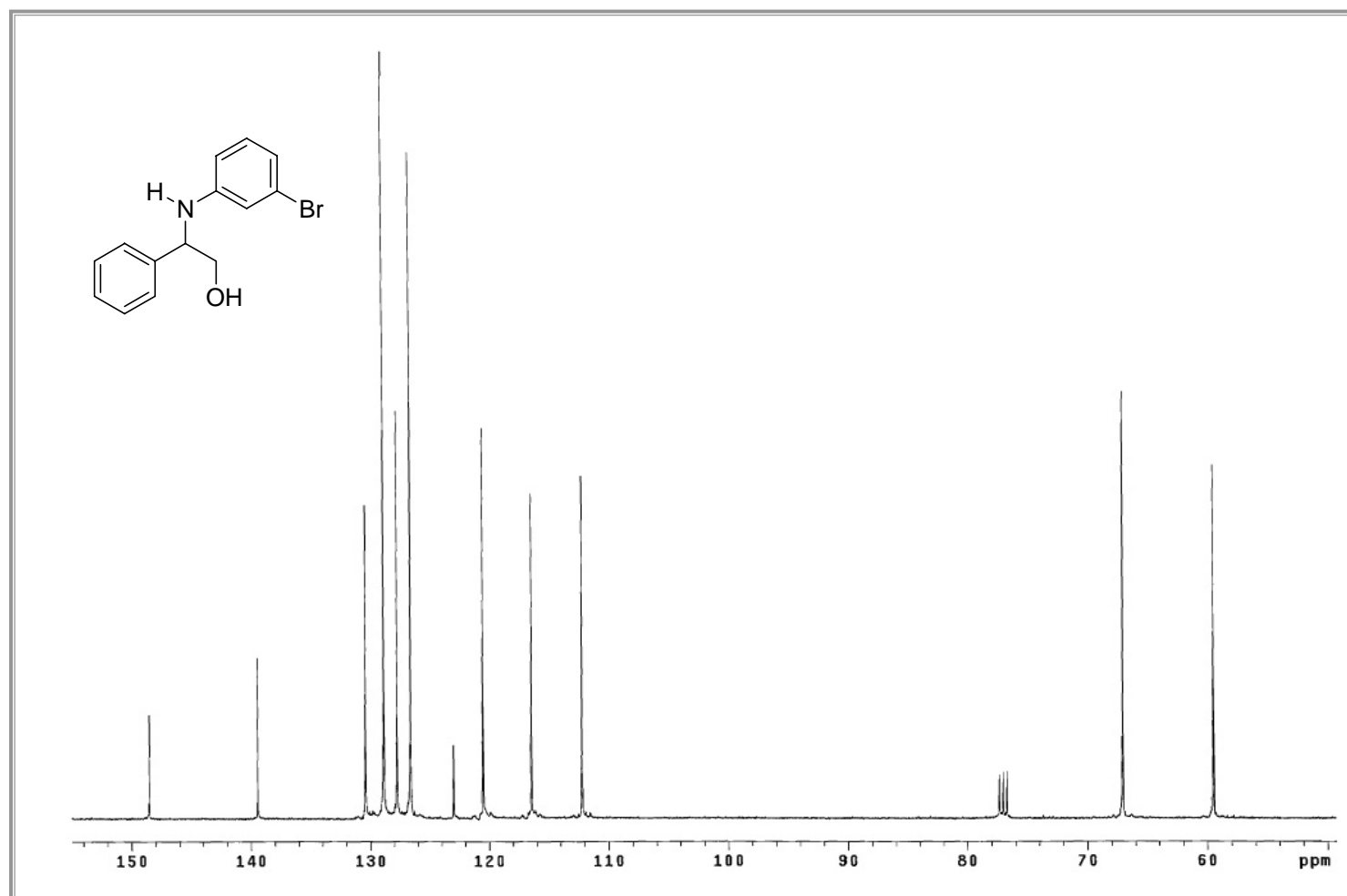
RMN de ^1H de 2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18f**).



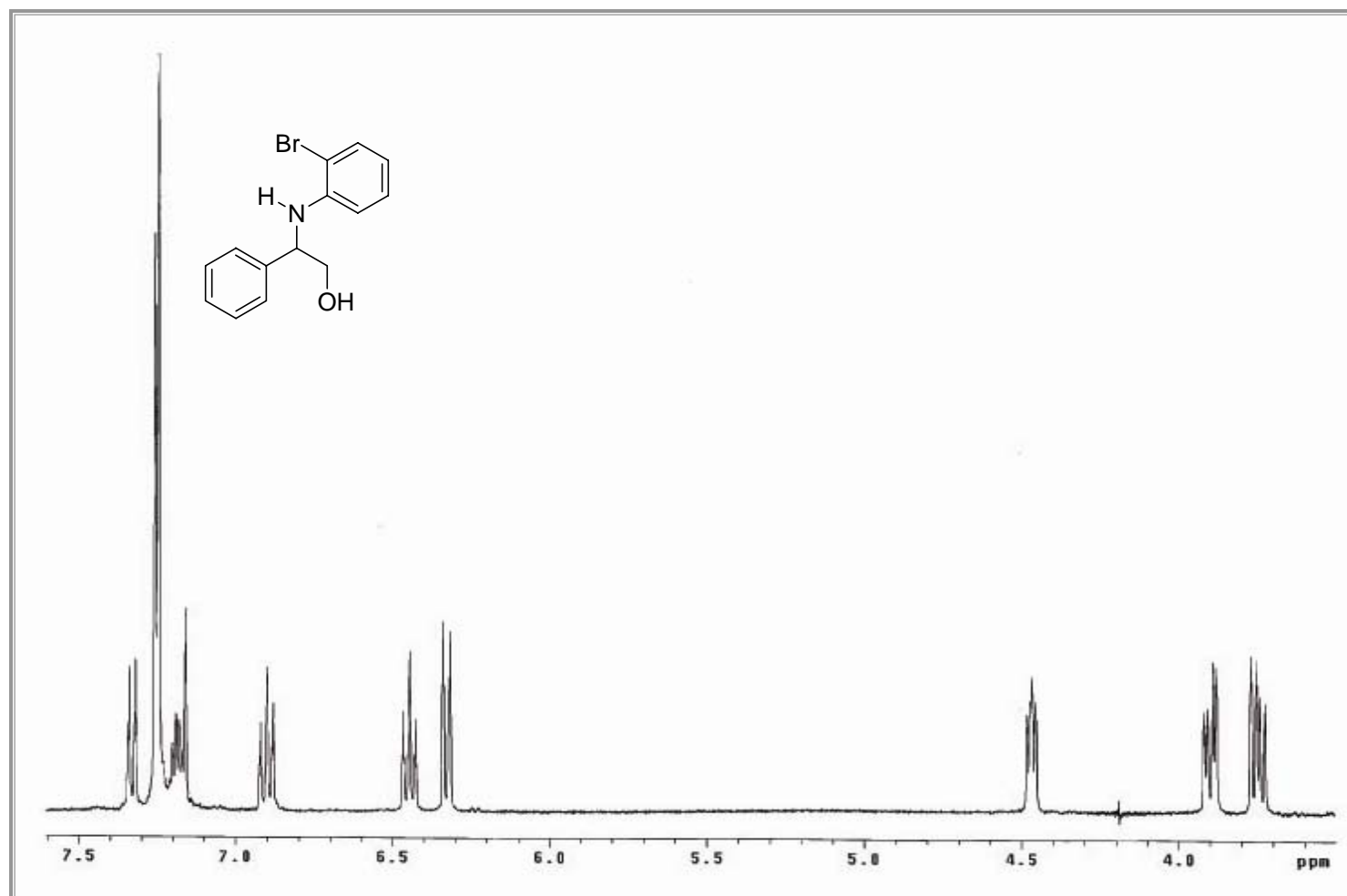
RMN de ^{13}C de 2-(4'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18f**).



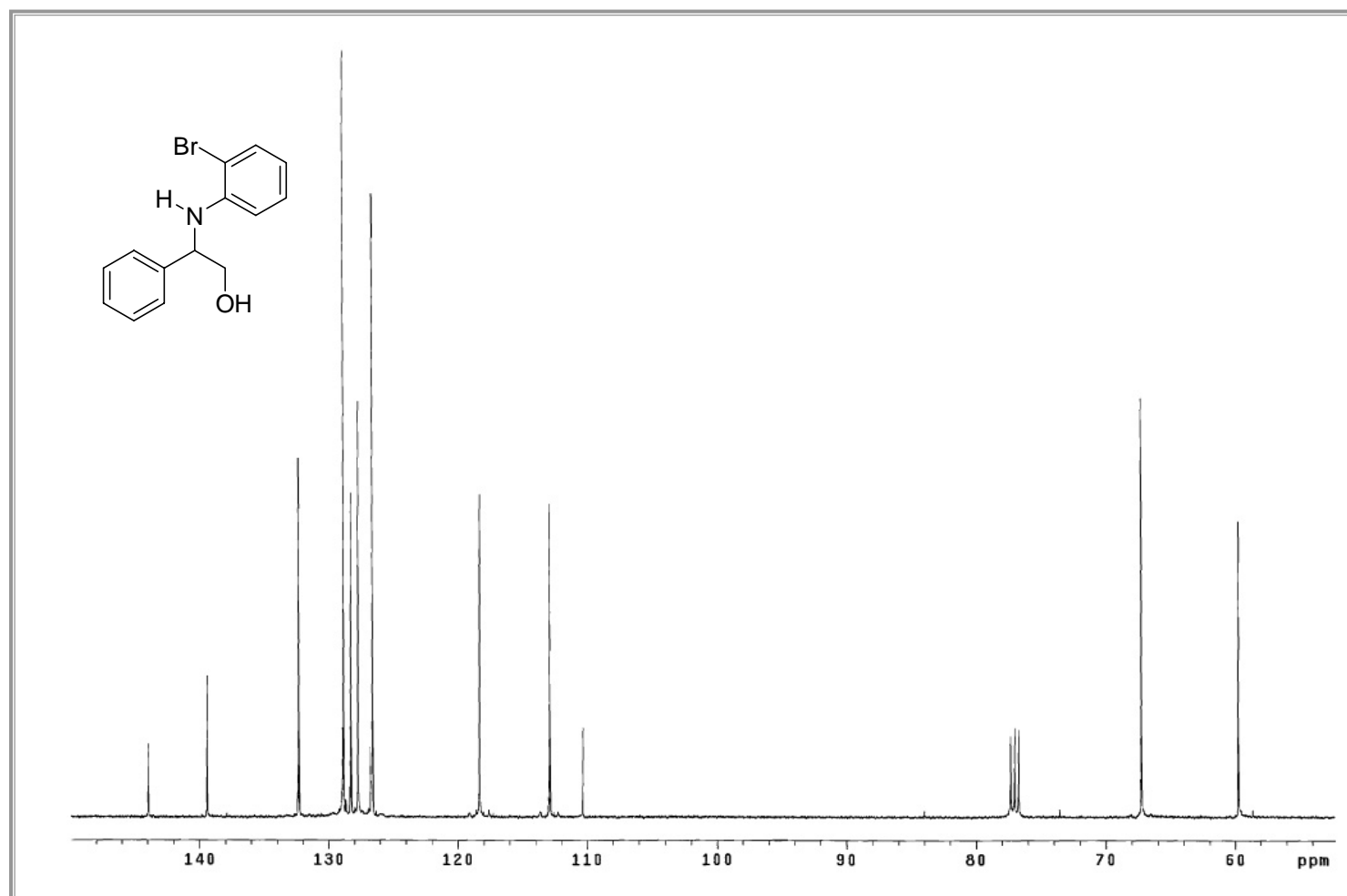
RMN de ^1H de 2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18g**).



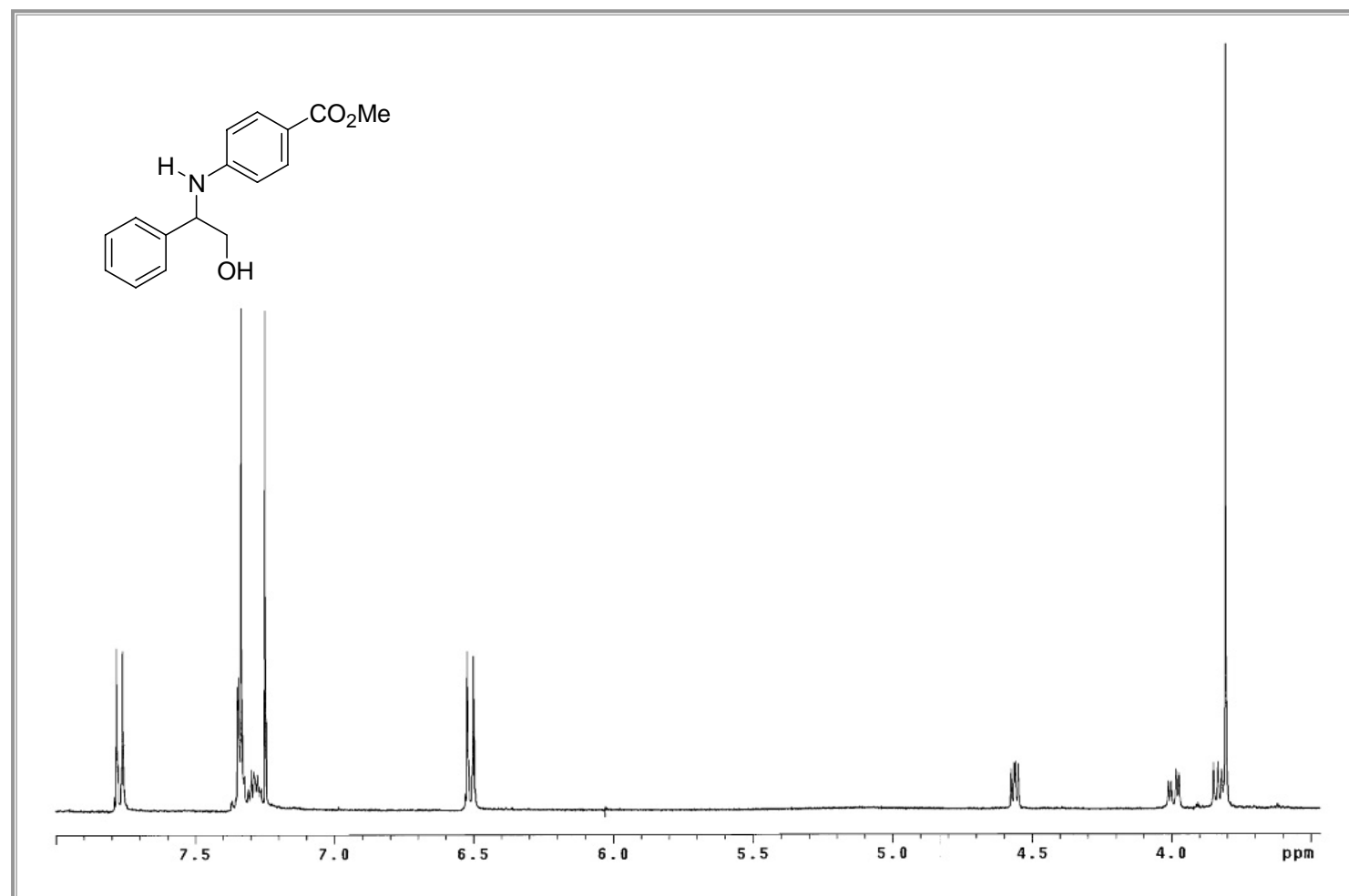
RMN de ^{13}C de 2-(3'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18g**).



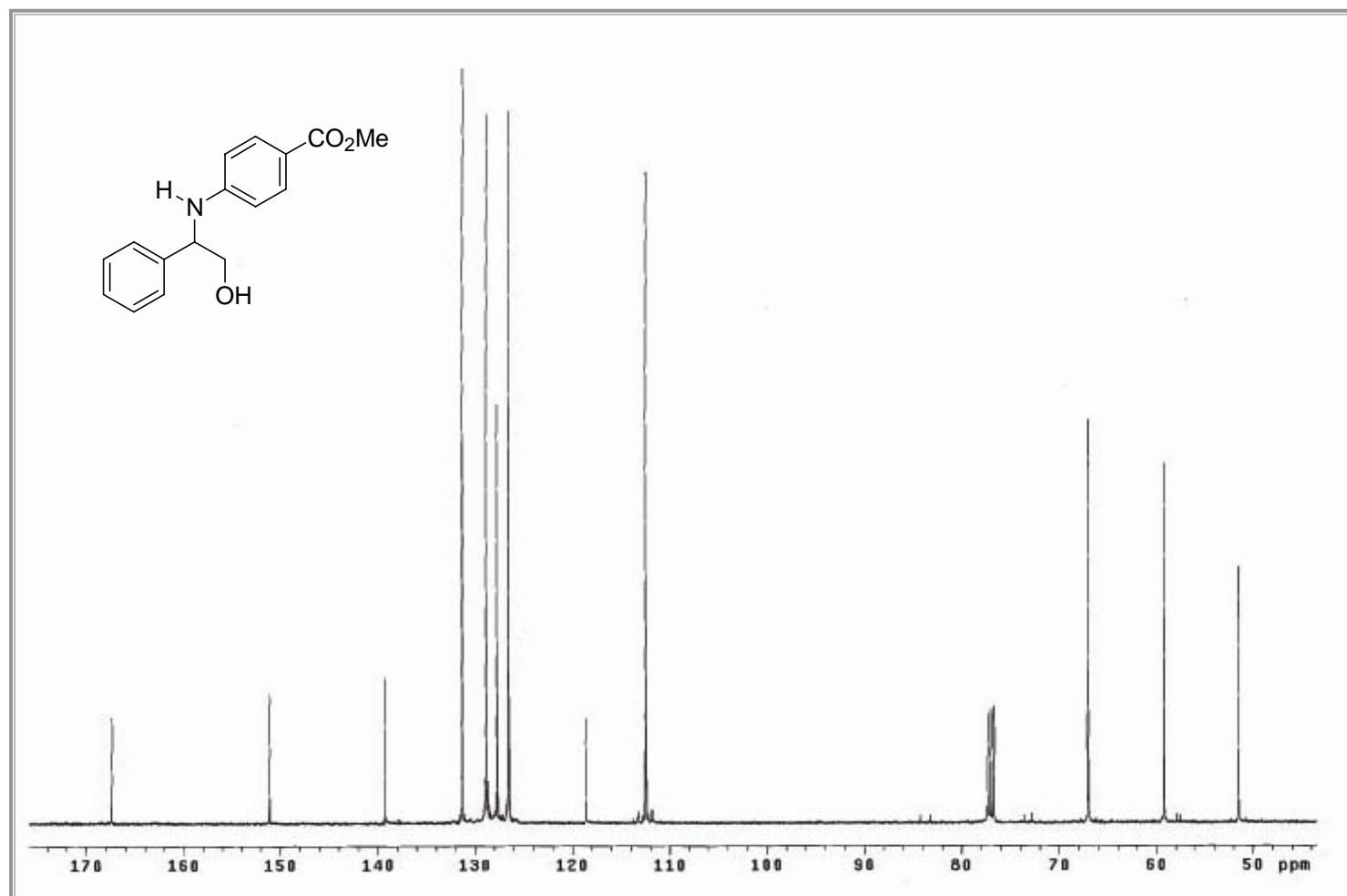
RMN de ^1H de 2-(2'-bromofenilamino)-2-feniletanol (**18h**).



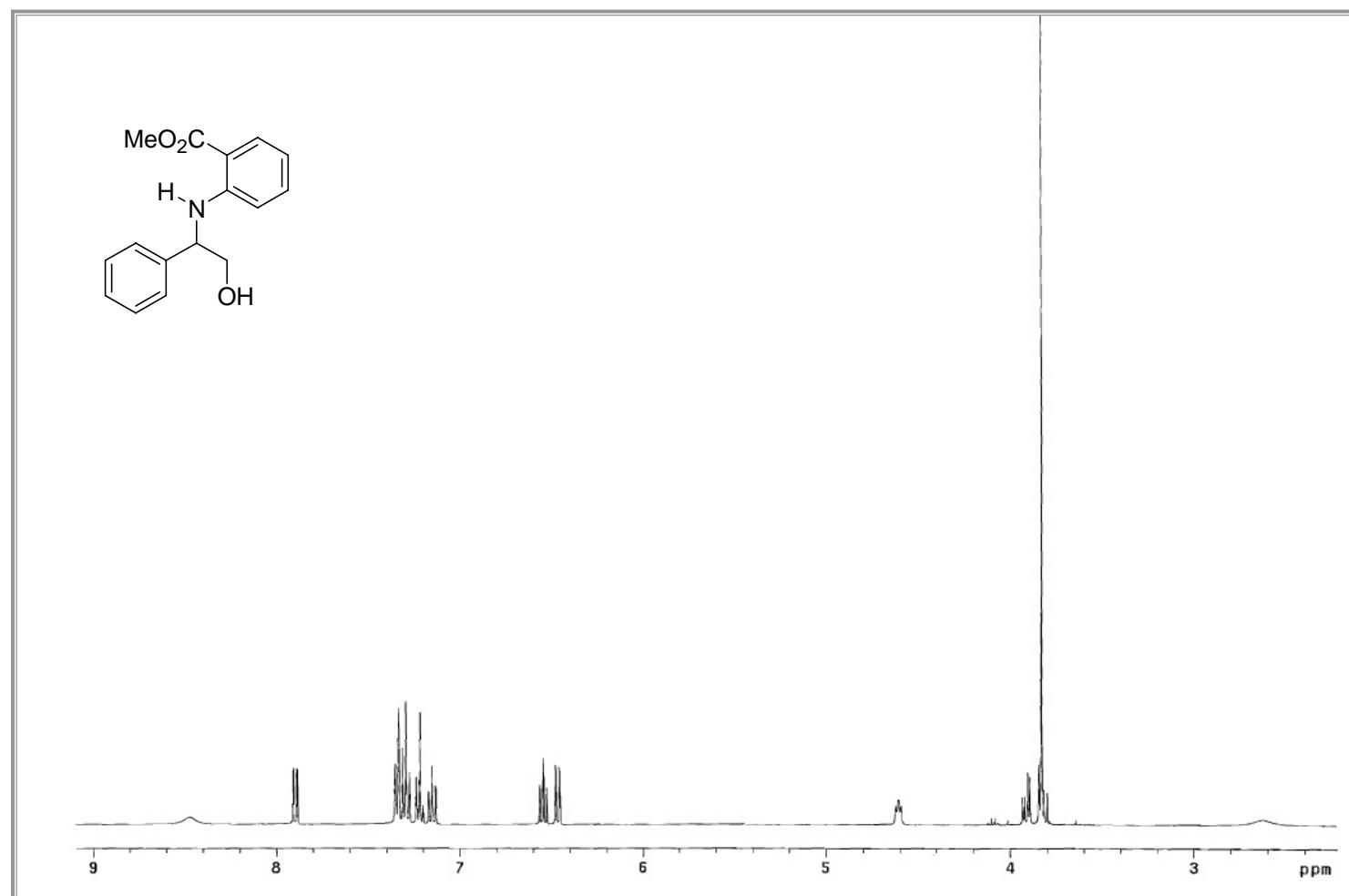
RMN de ^{13}C de 2-(2'-bromophenylamino)-2-feniletanol (**18h**).



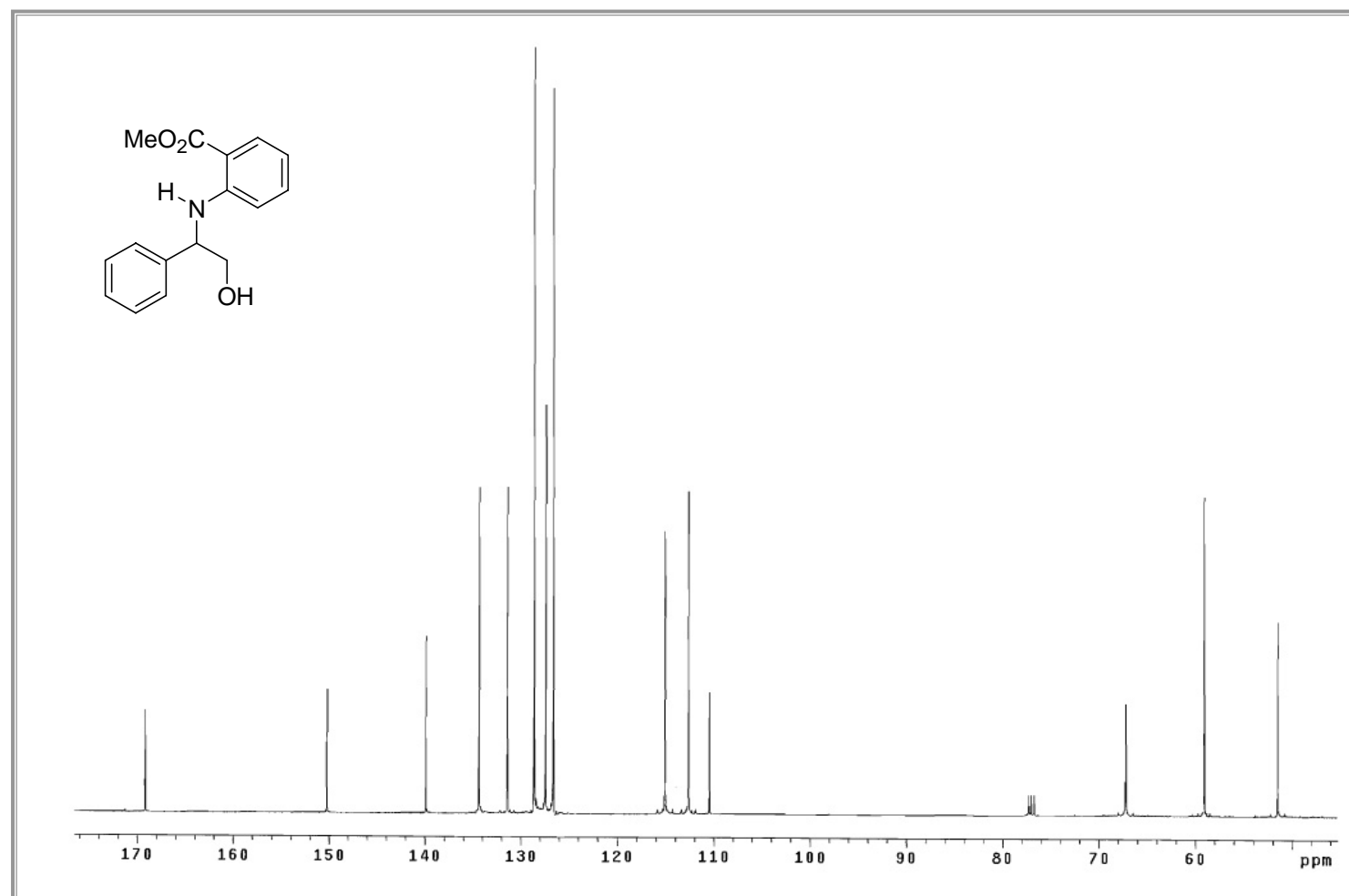
RMN de ¹H de 4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18i**).



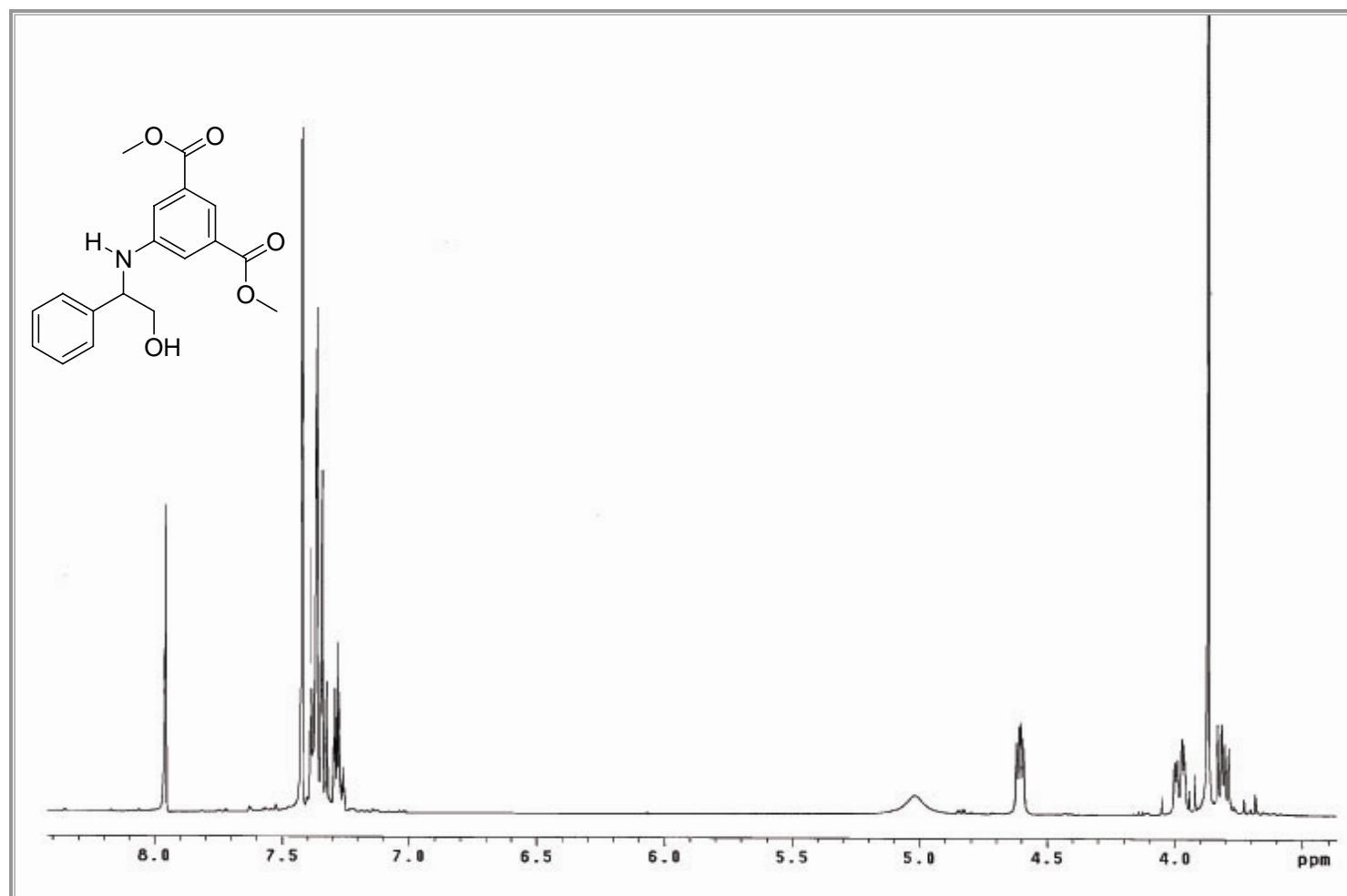
RMN de ¹³C de 4-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18i**).



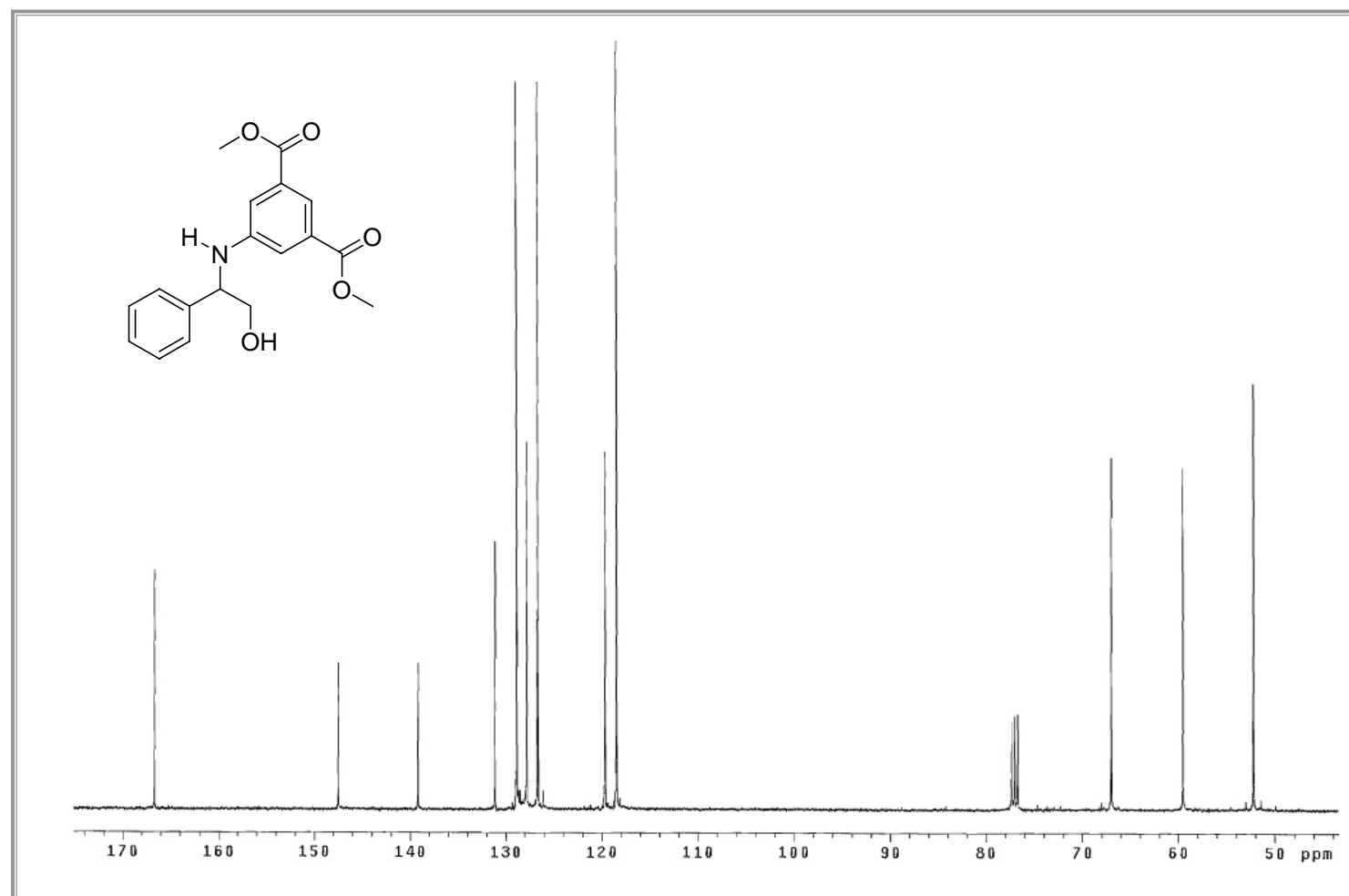
RMN de ¹H de 2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18j**).



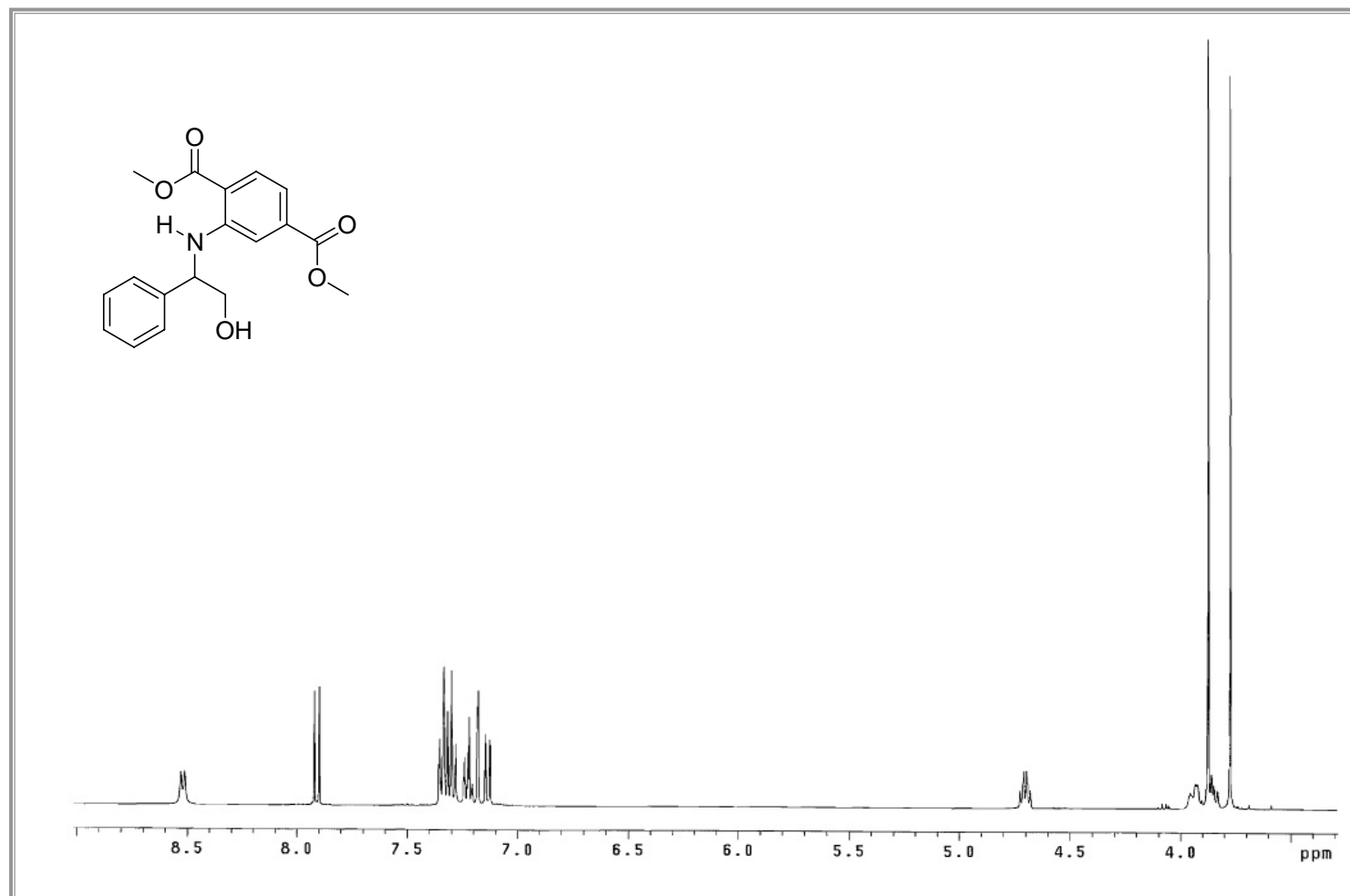
RMN de ^{13}C de 2-(1'-fenil-2'-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18j**).



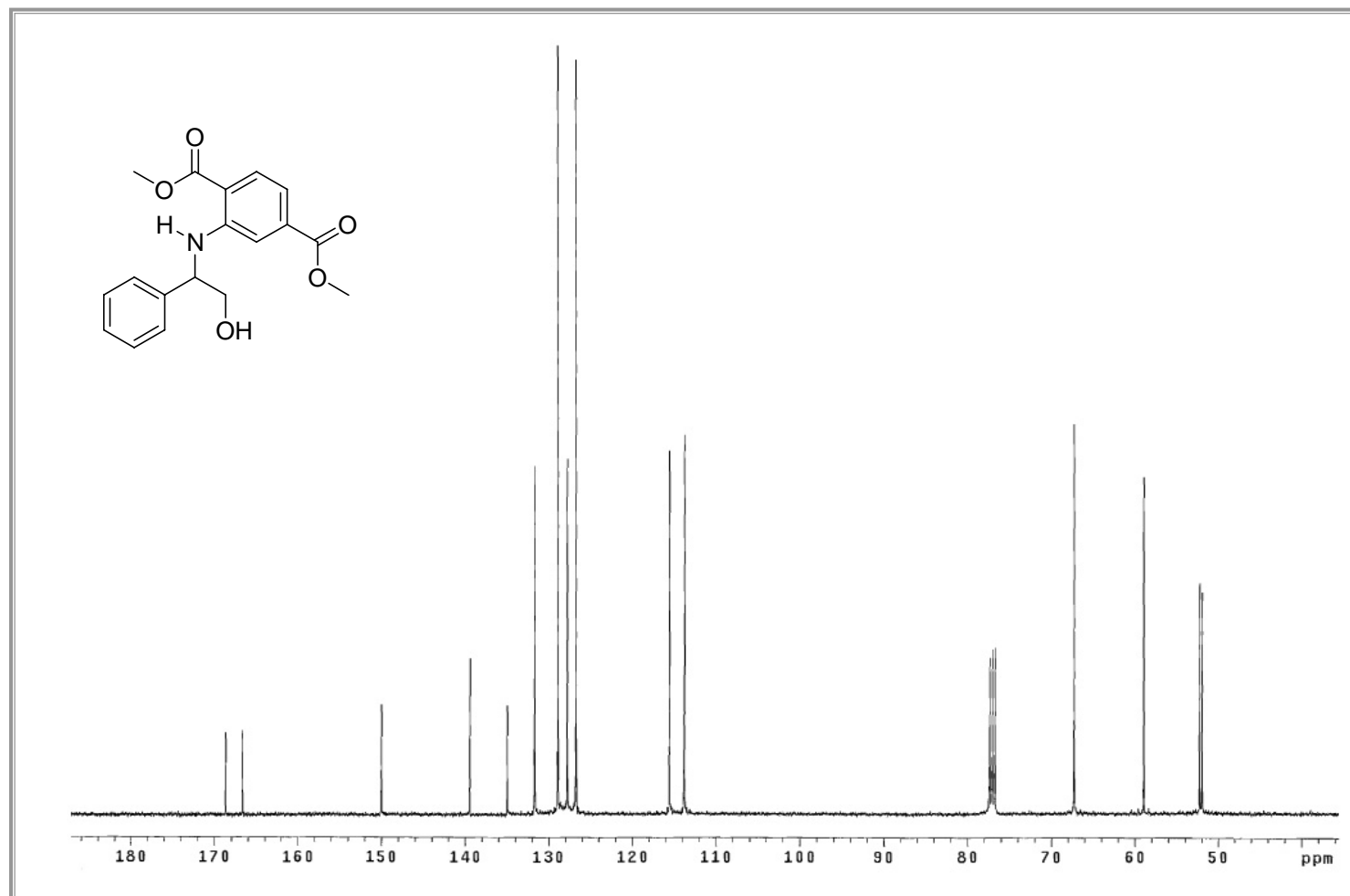
RMN de ^1H de 3-metoxycarbonil-5-(1'-fenil-2-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**18k**).



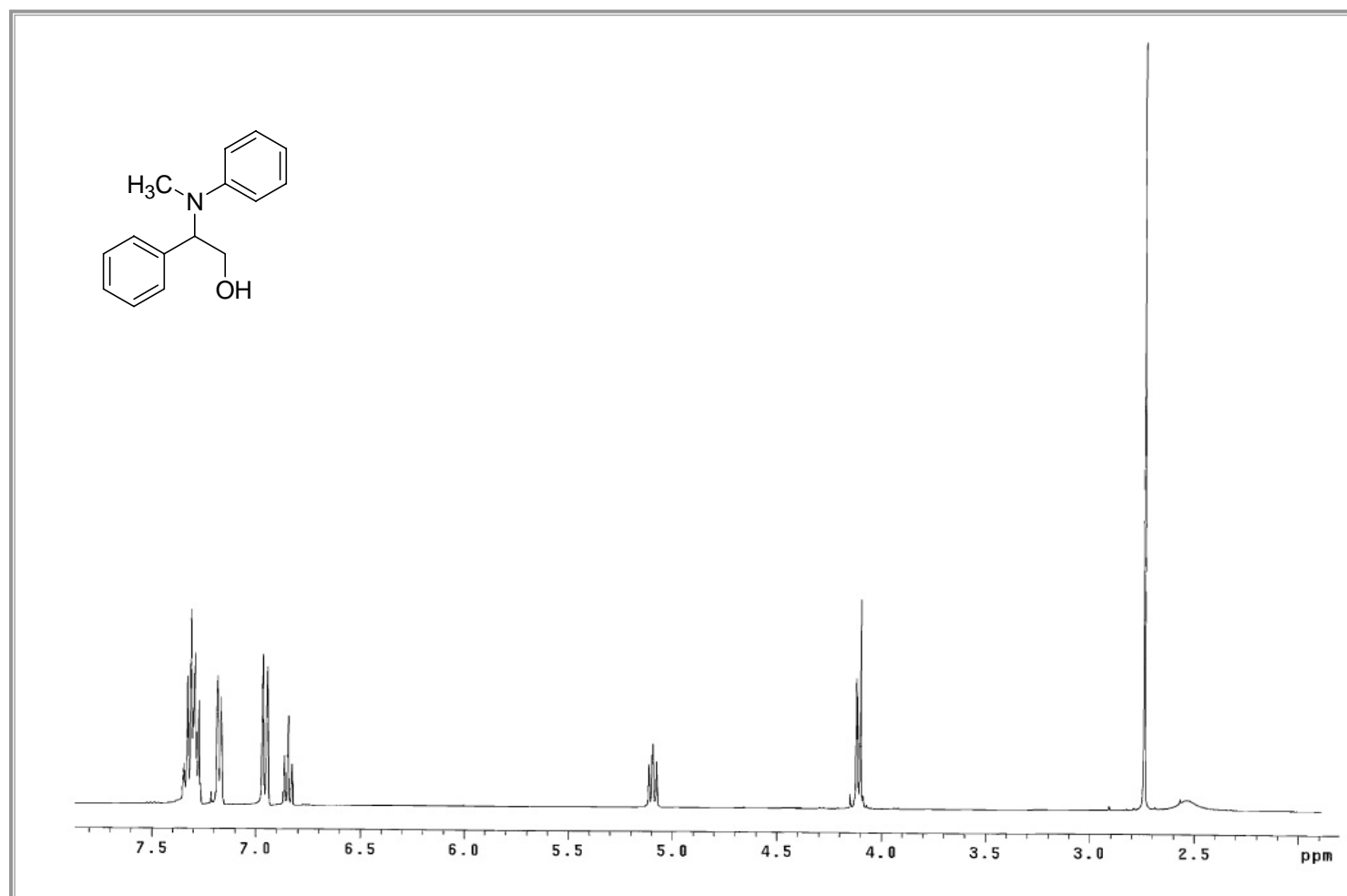
RMN de ^{13}C de 3-metoxycarbonil-5-(1'-fenil-2-hidroxiethylamino)benzoato de metilo (**18k**).



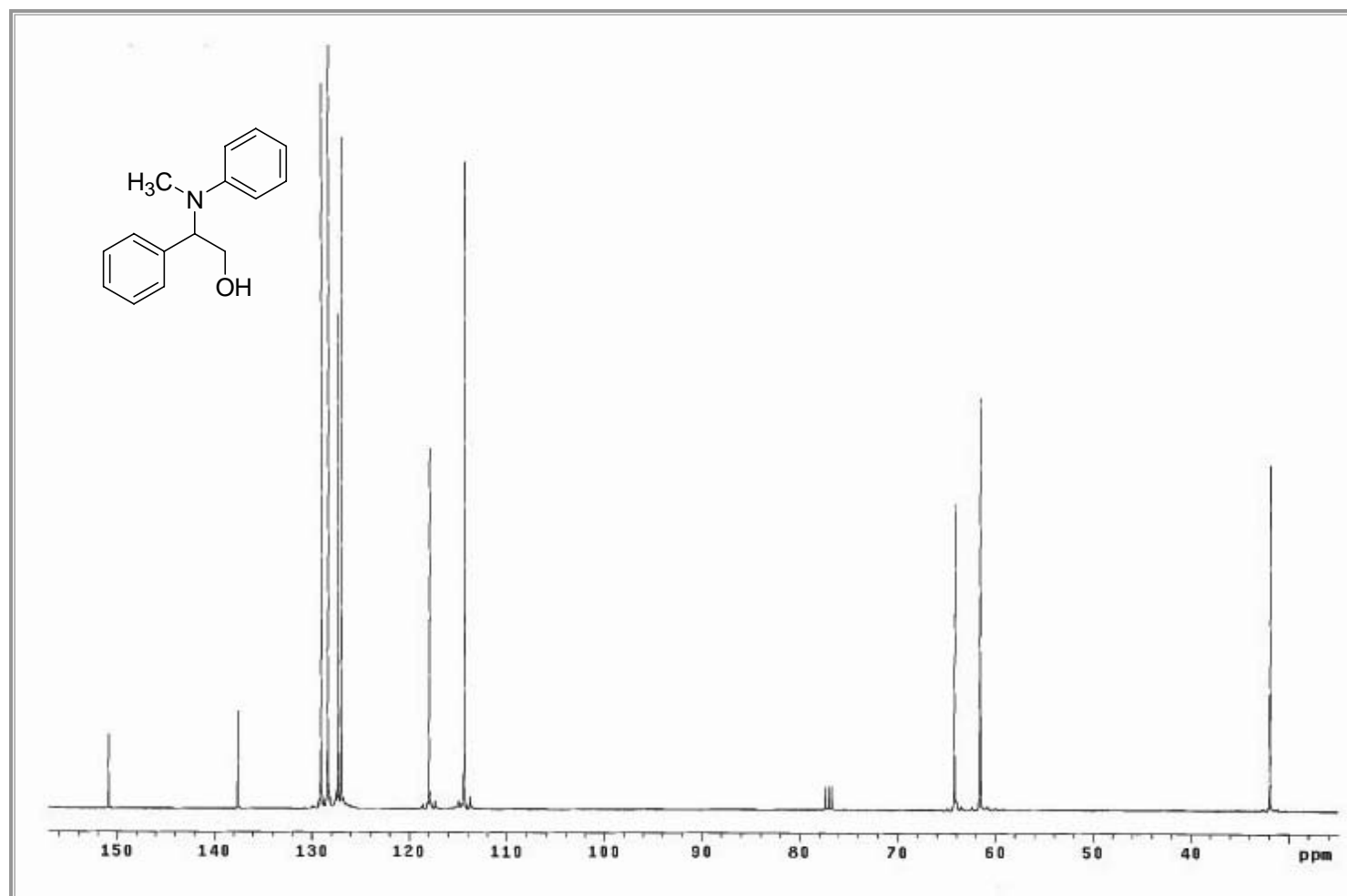
RMN de ¹H de 4-metoxicarbonil-2-(1'-fenil-2-hidroxiethylamino)benzoato de metilo (**18I**).



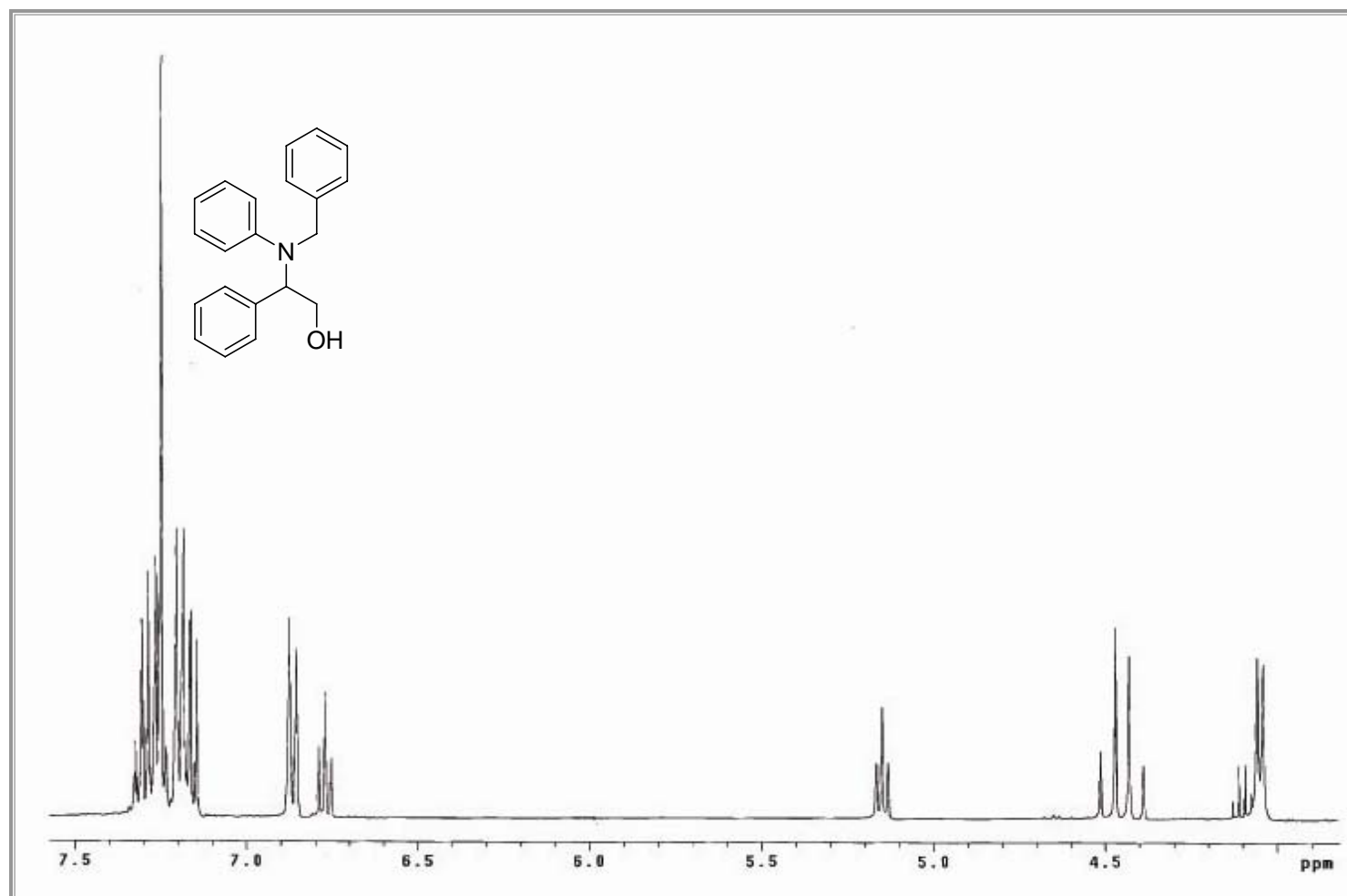
RMN de ¹³C de 4-metoxicarbonil-2-(1'-fenil-2-hidroxietilamino)benzoato de metilo (**181**).



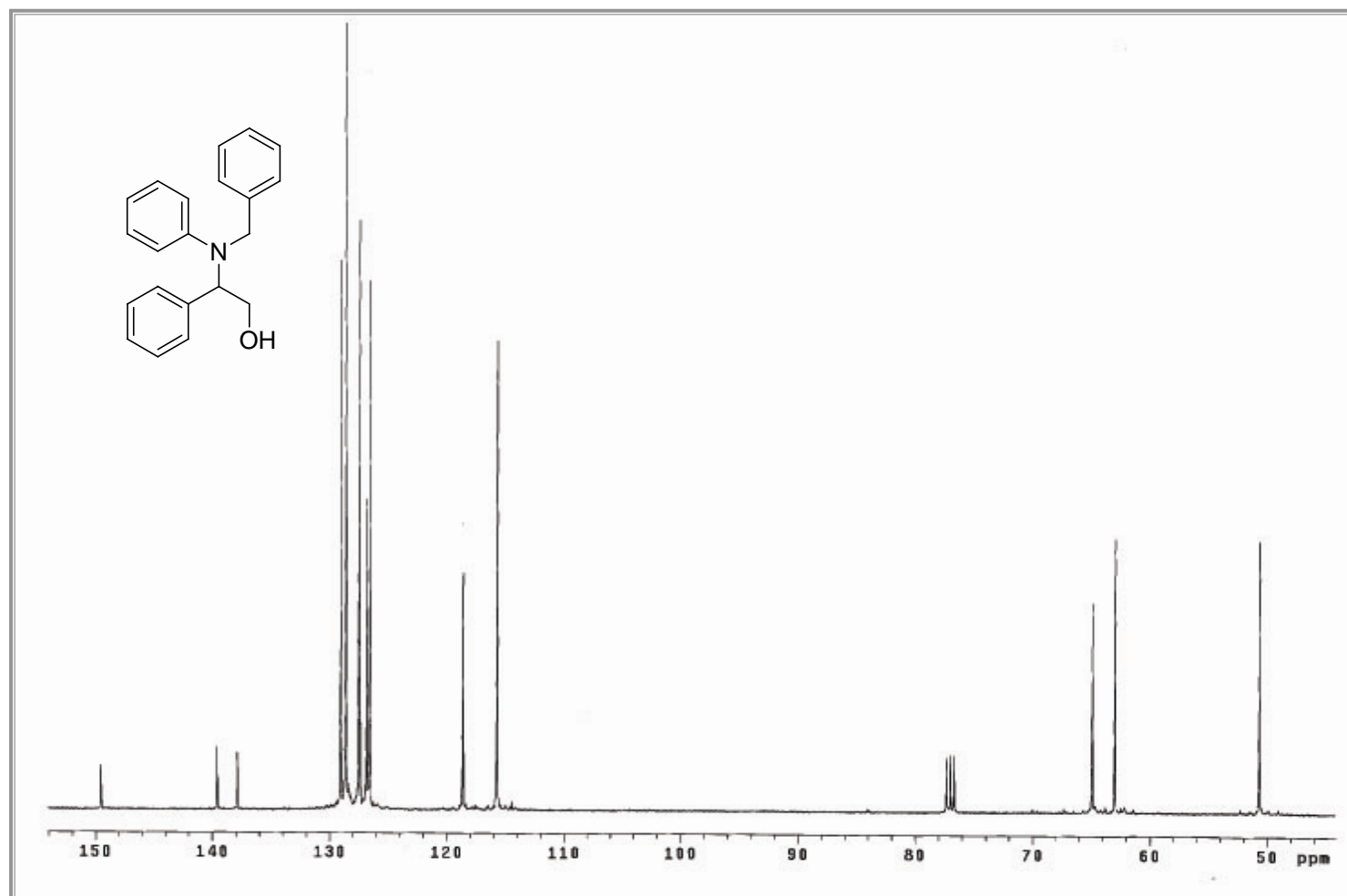
RMN de ^1H de 2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (**18m**).



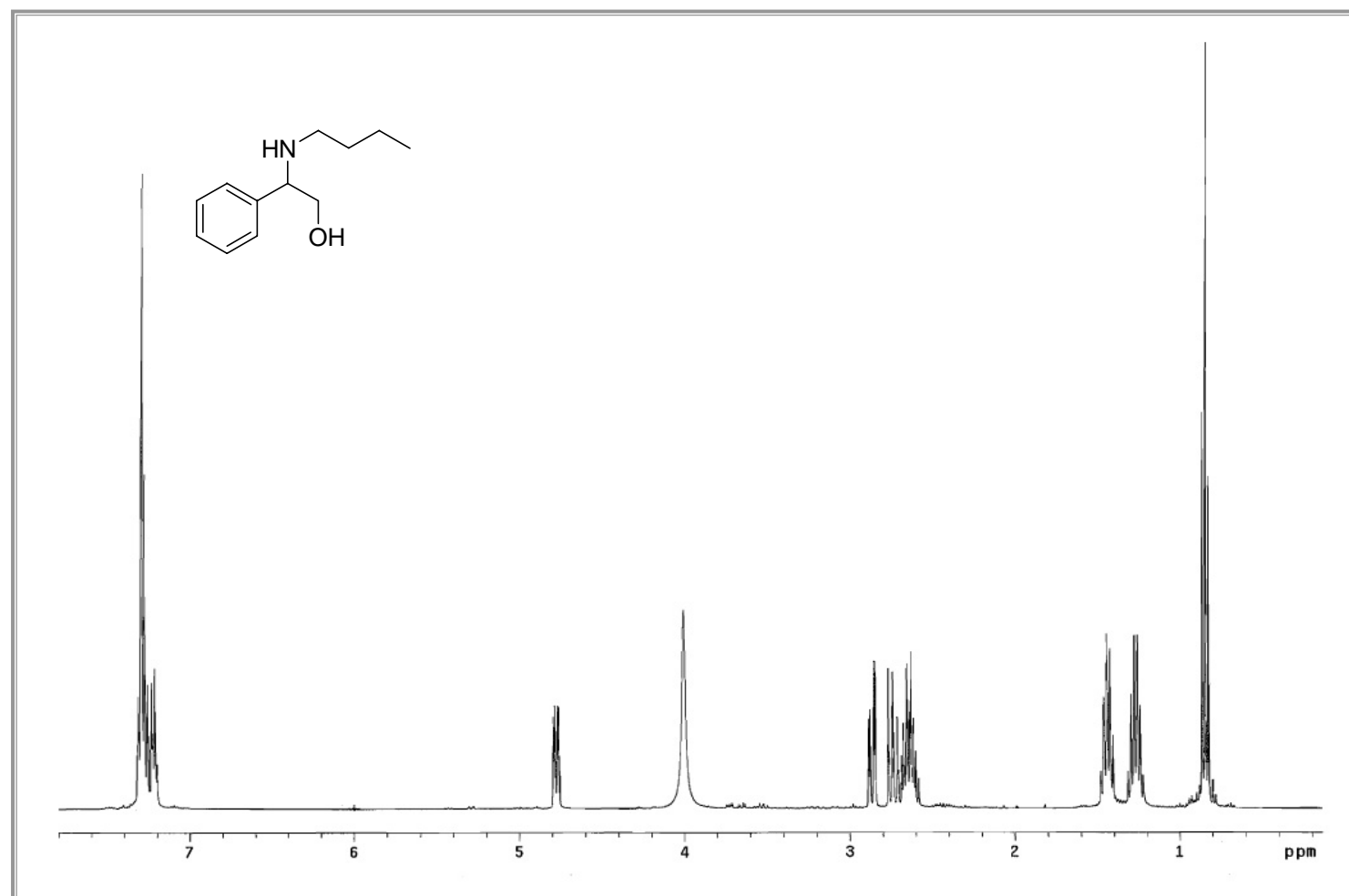
RMN de ^{13}C de 2-(fenilmetilamino)-2-feniletanol (**18m**).



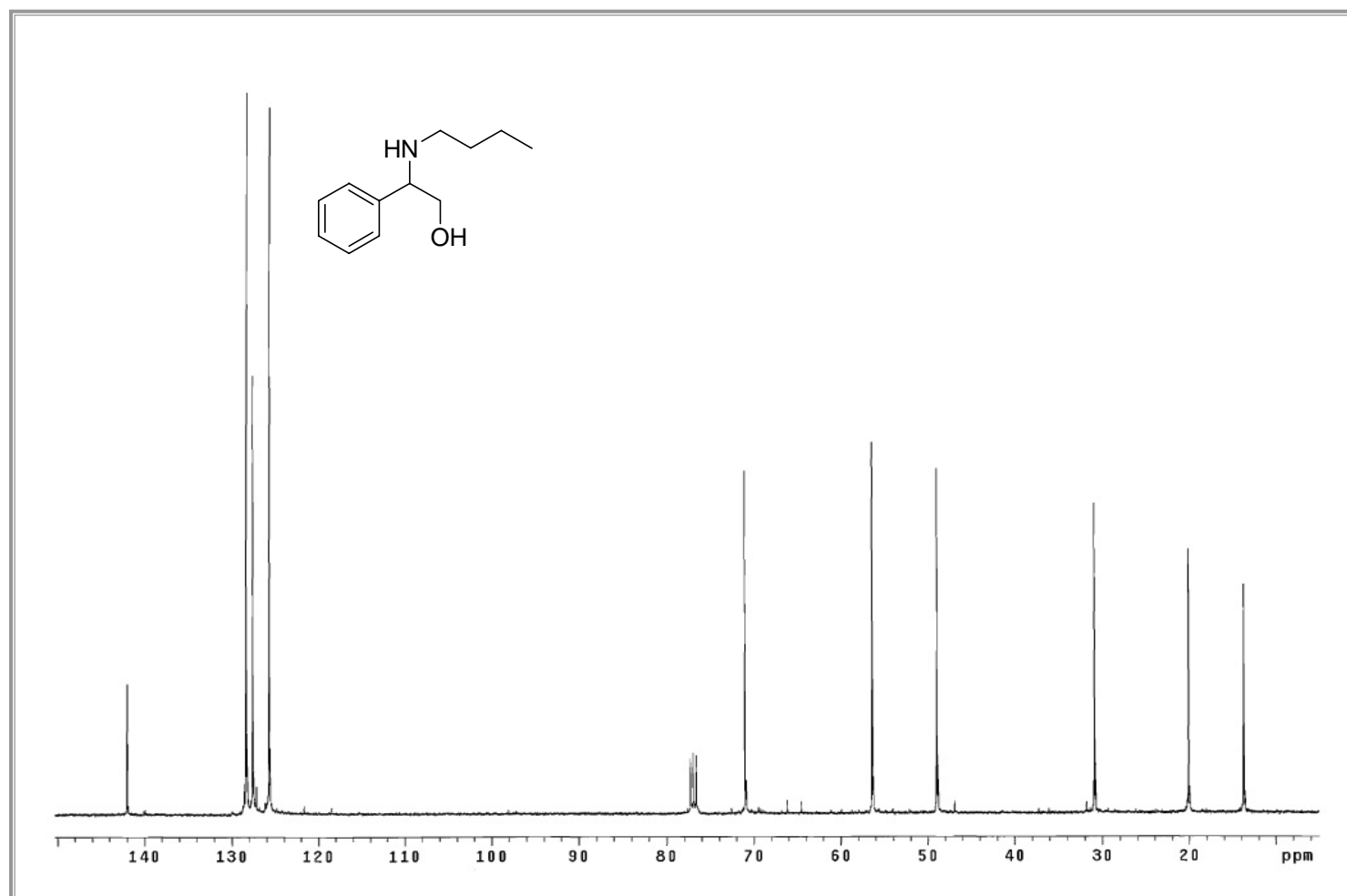
RMN de ^1H de 2-(benzilfenilamino)-2-feniletanol (**18n**).



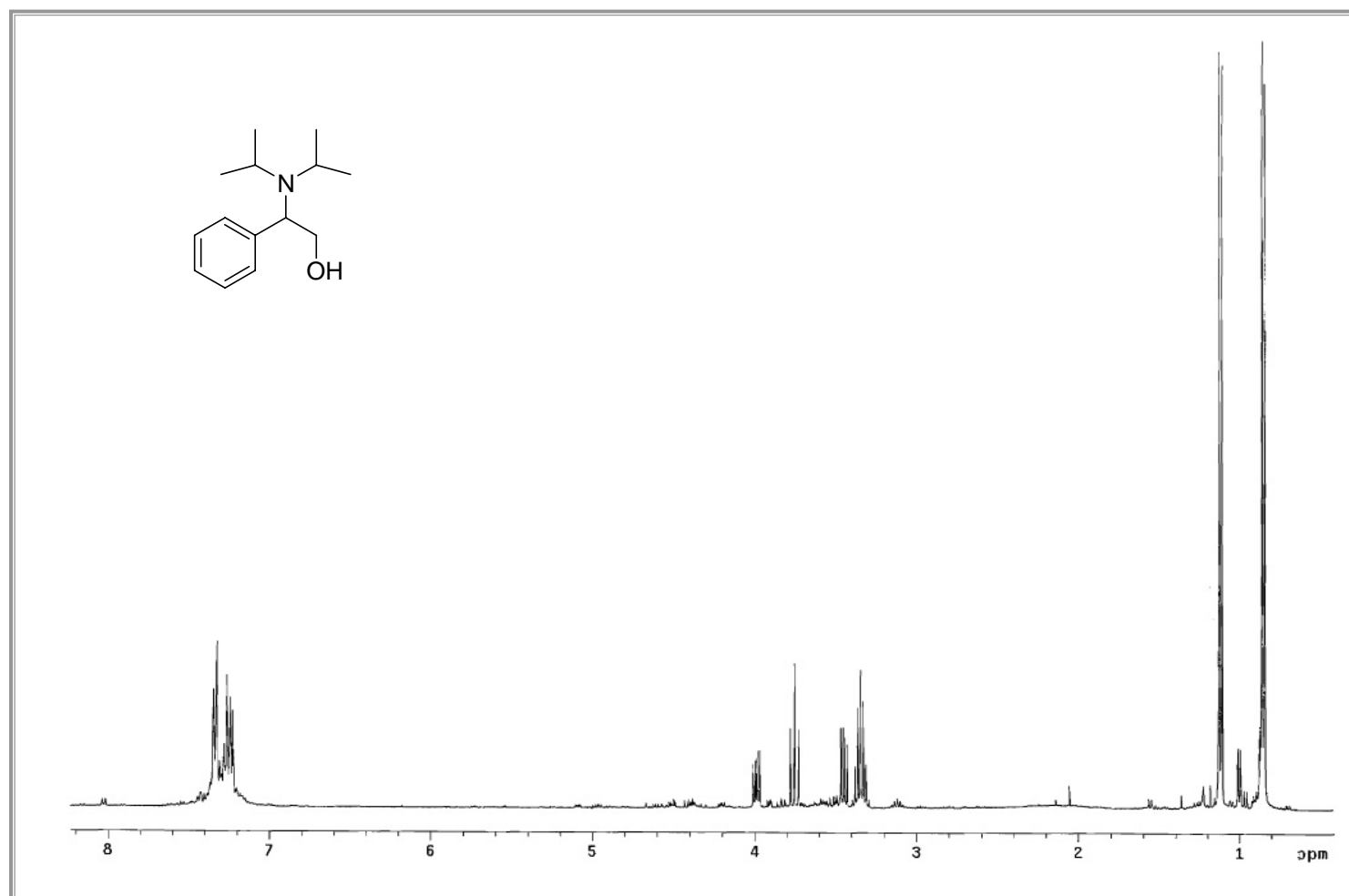
RMN de ^{13}C de 2-(benzilfenilamino)-2-feniletanol (**18n**).



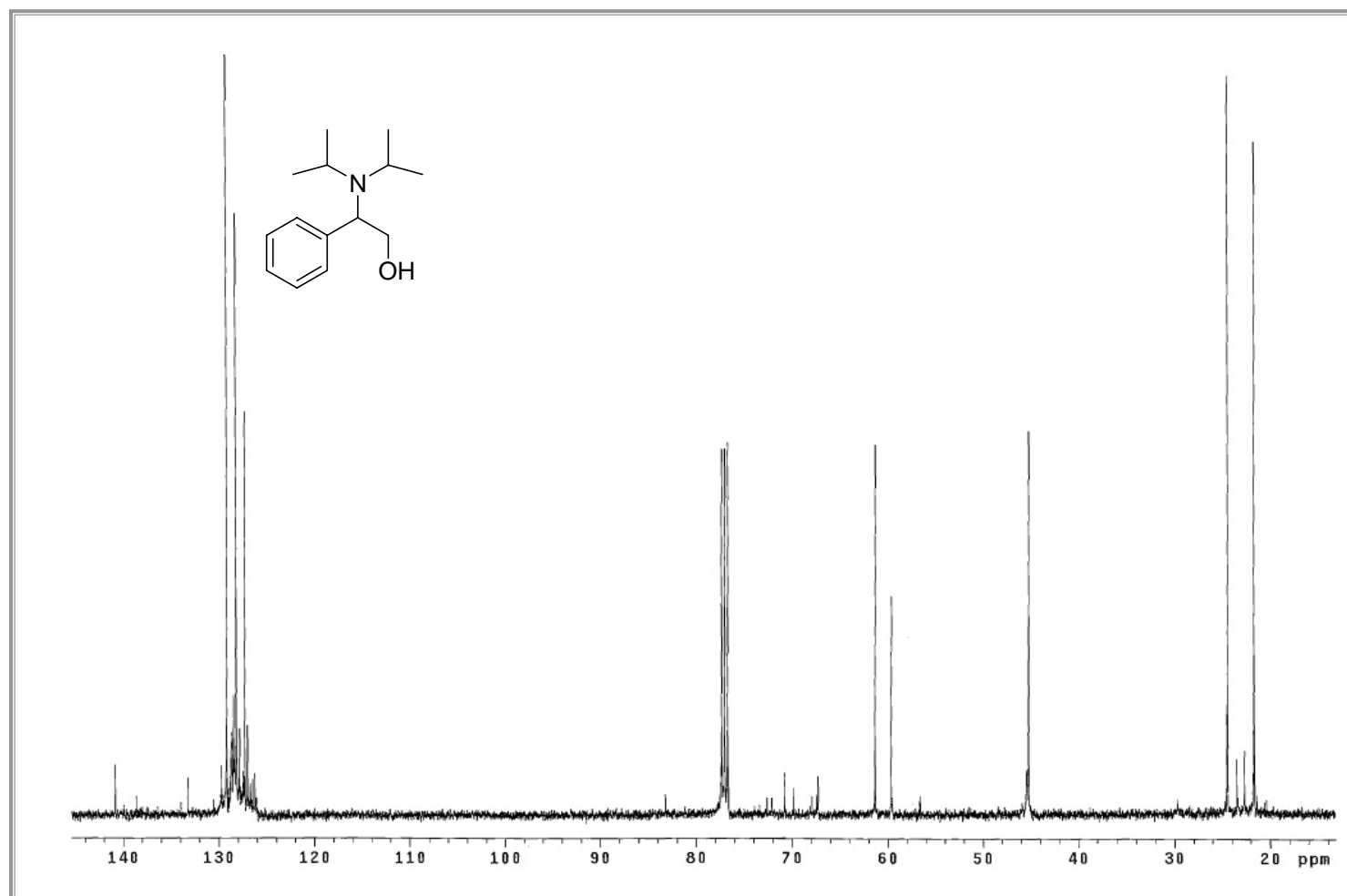
RMN de ^1H de 2-butylamino-2-feniletanol (**18o**).



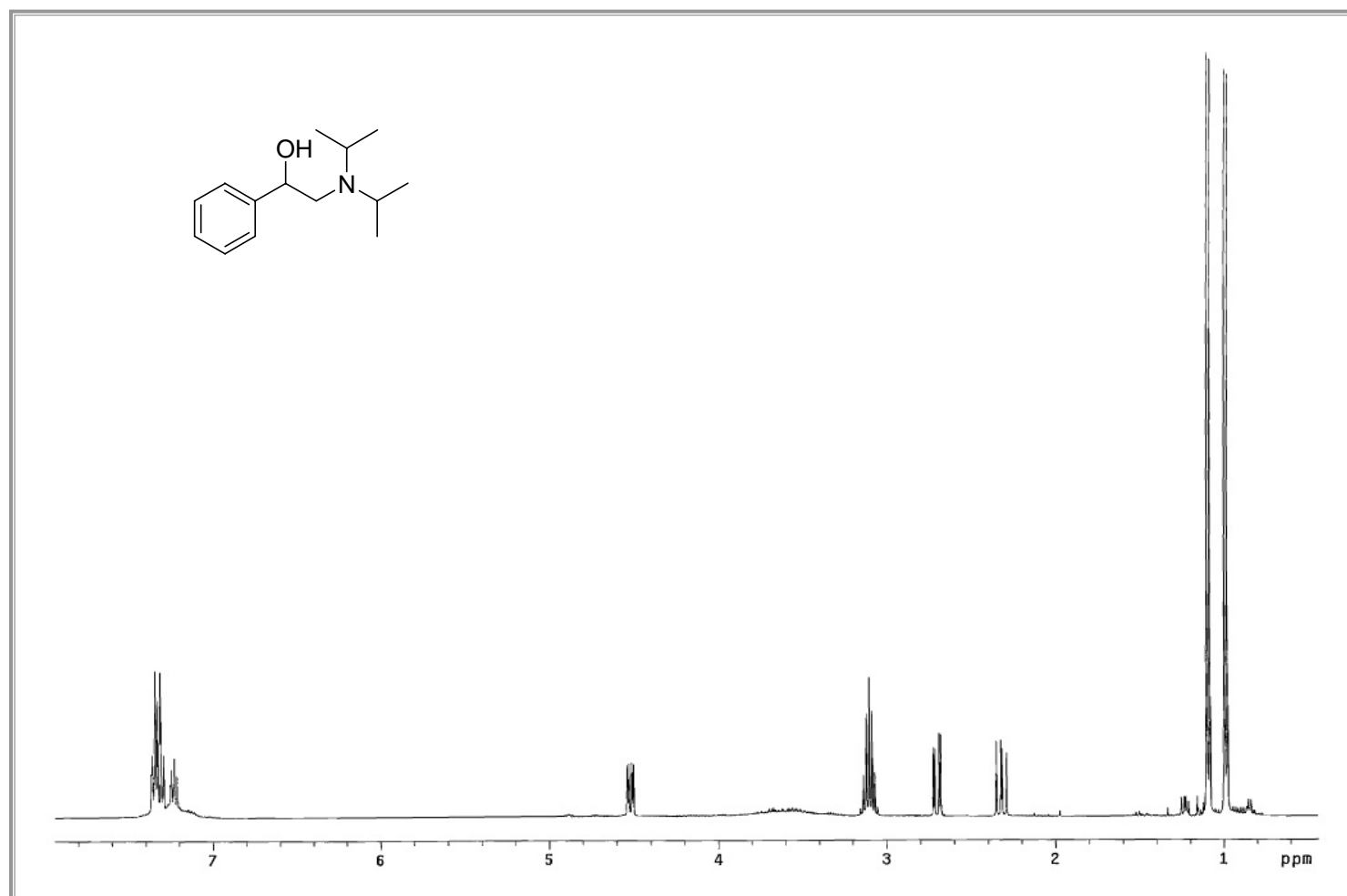
RMN de ^{13}C de 2-butylamino-2-feniletanol (**18o**).



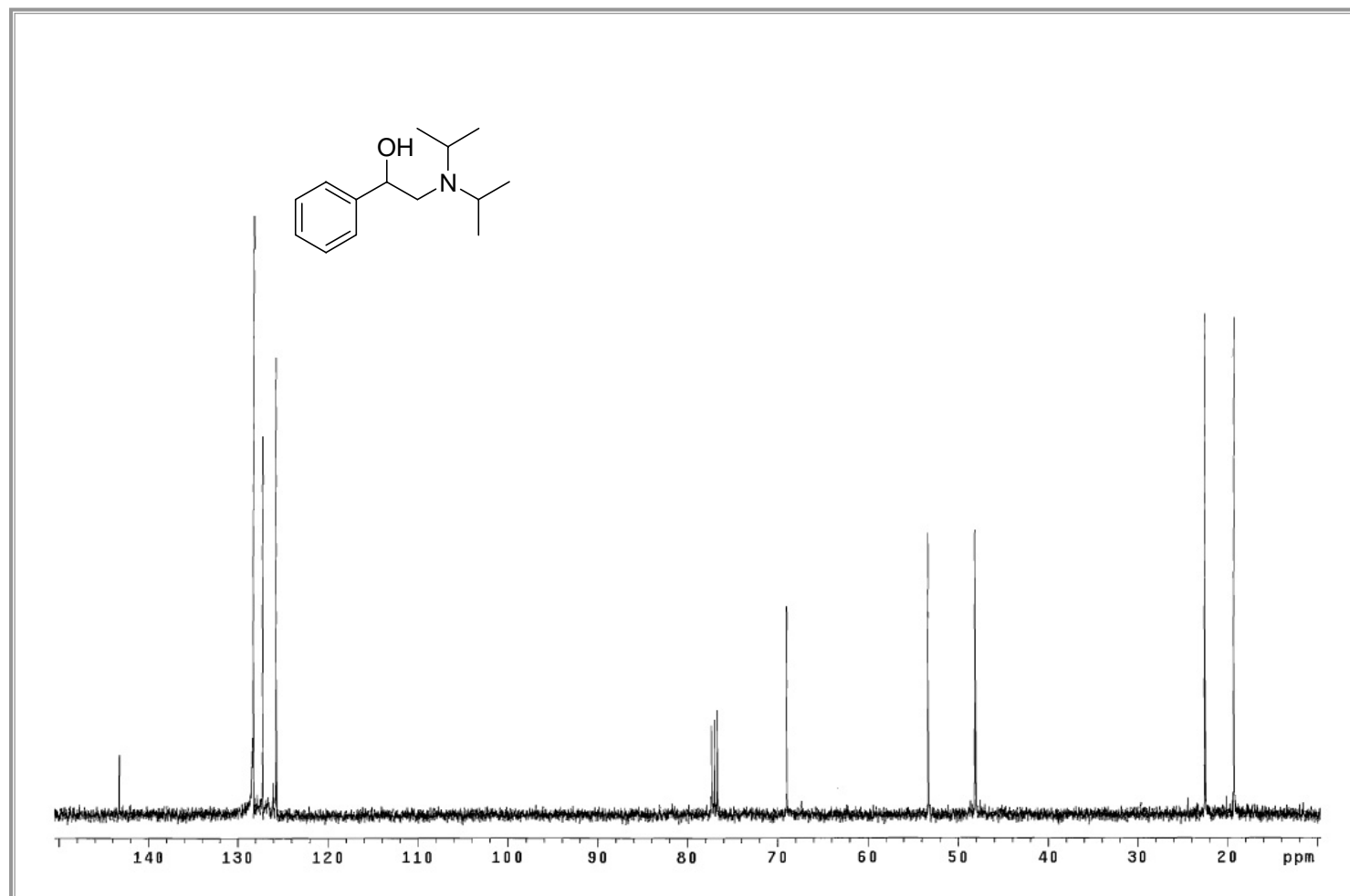
RMN de ^1H de 2-diisopropilamino-2-feniletanol (**18p**).



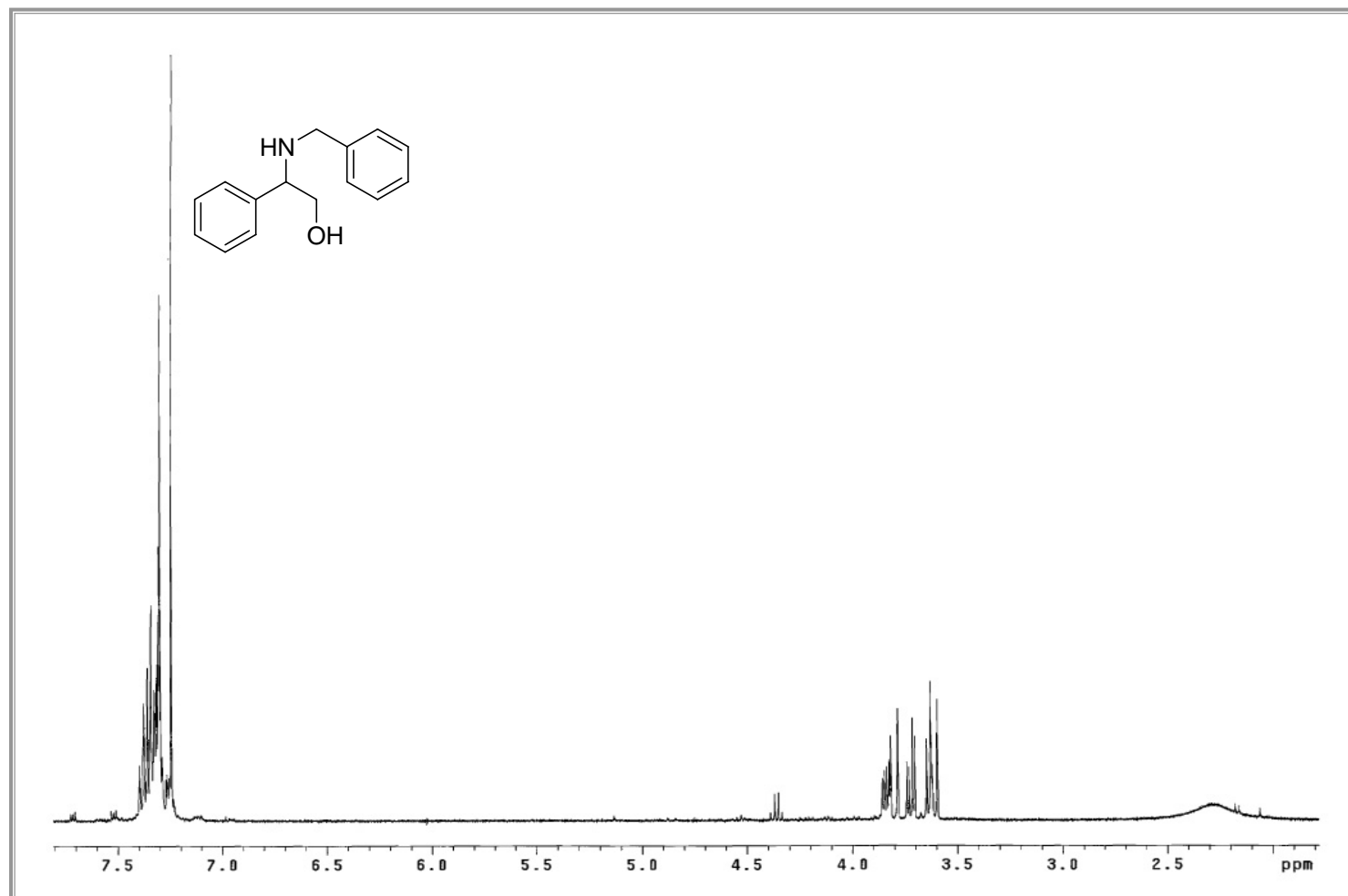
RMN de ^{13}C de 2-diisopropilamino-2-feniletanol (**18p**).



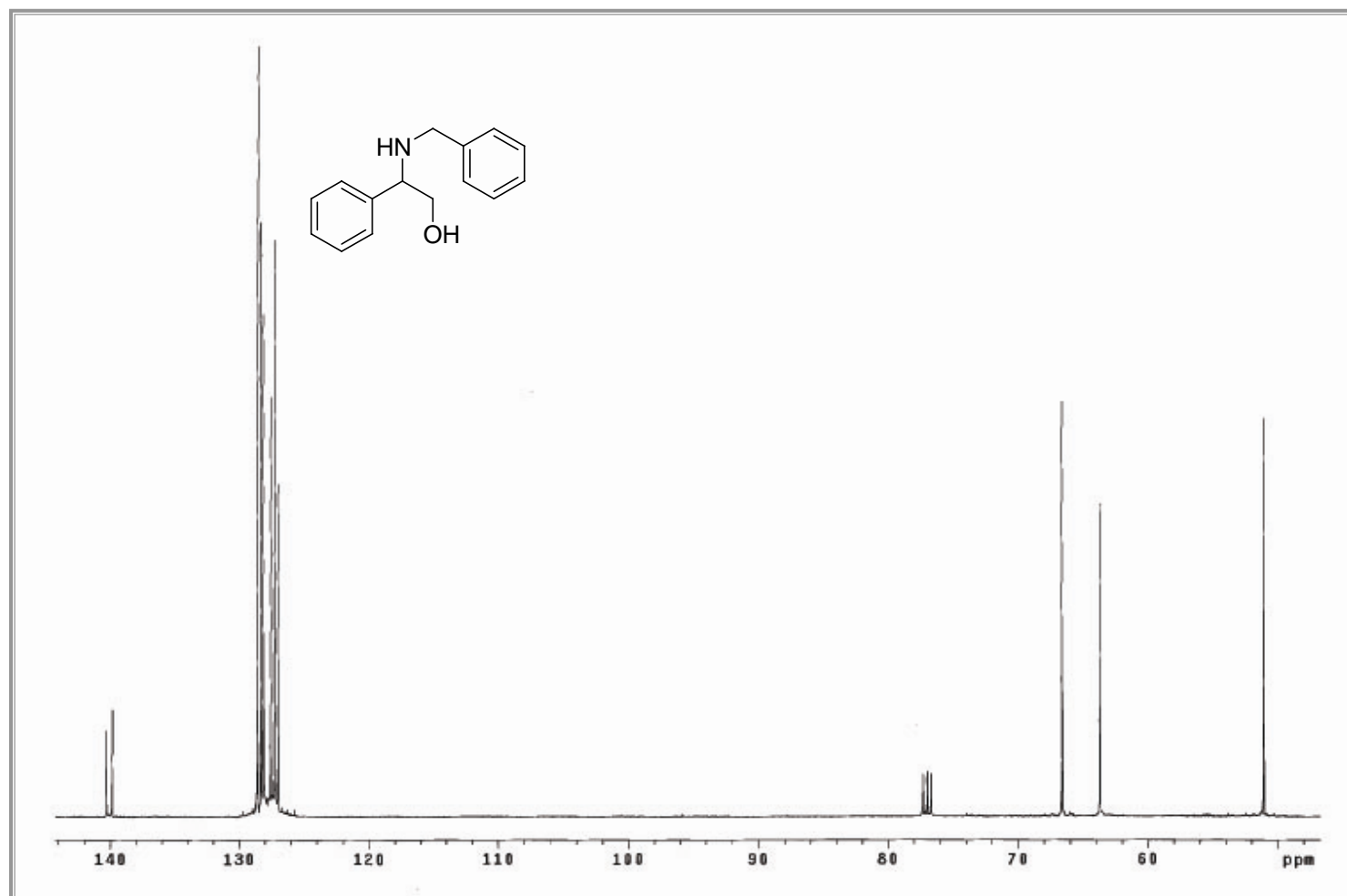
RMN de ¹H de 2-diisopropylamino-1-feniletanol (**19p**).



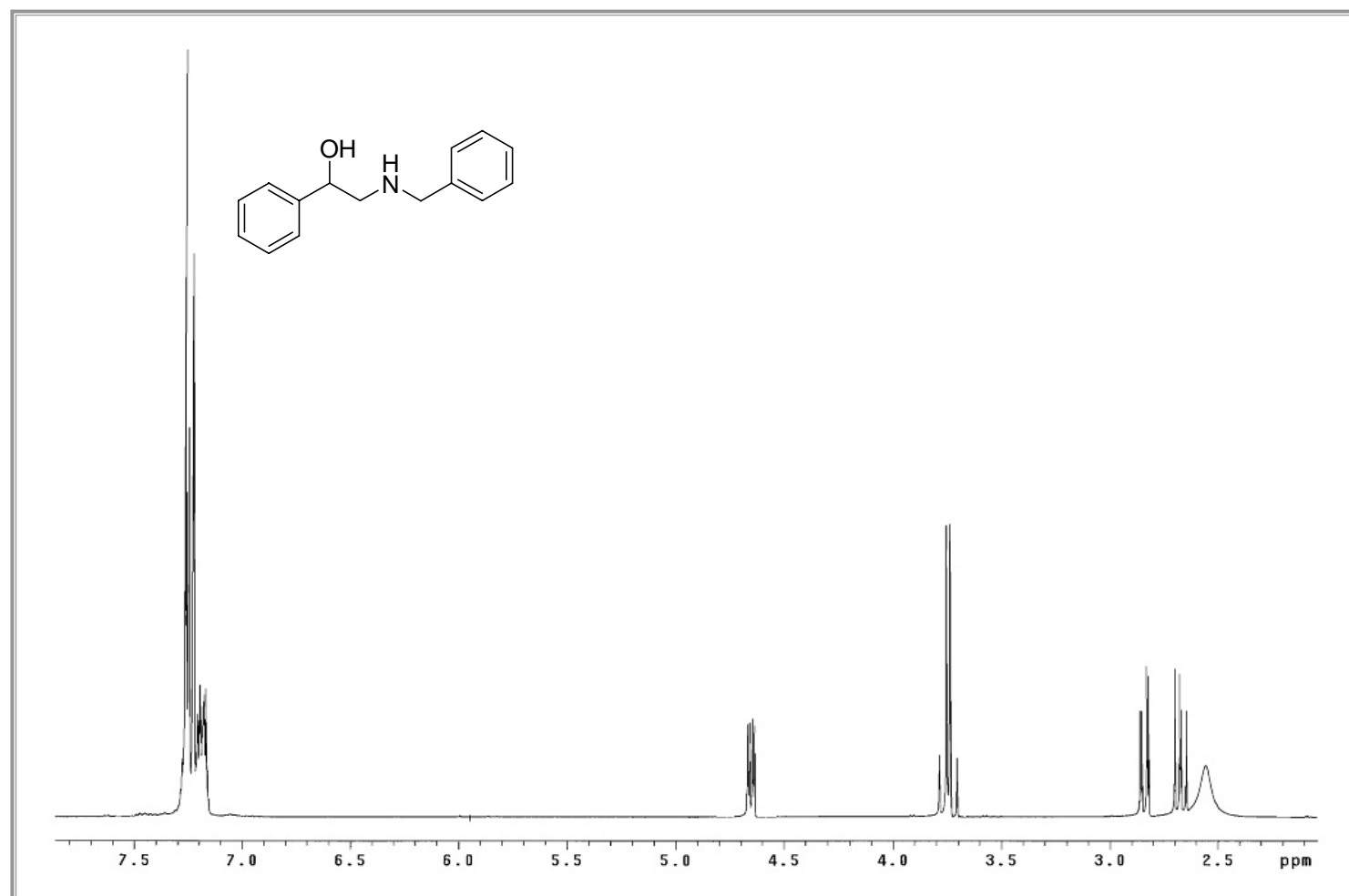
RMN de ¹³C de 2-diisopropilamino-1-feniletanol (**19p**).



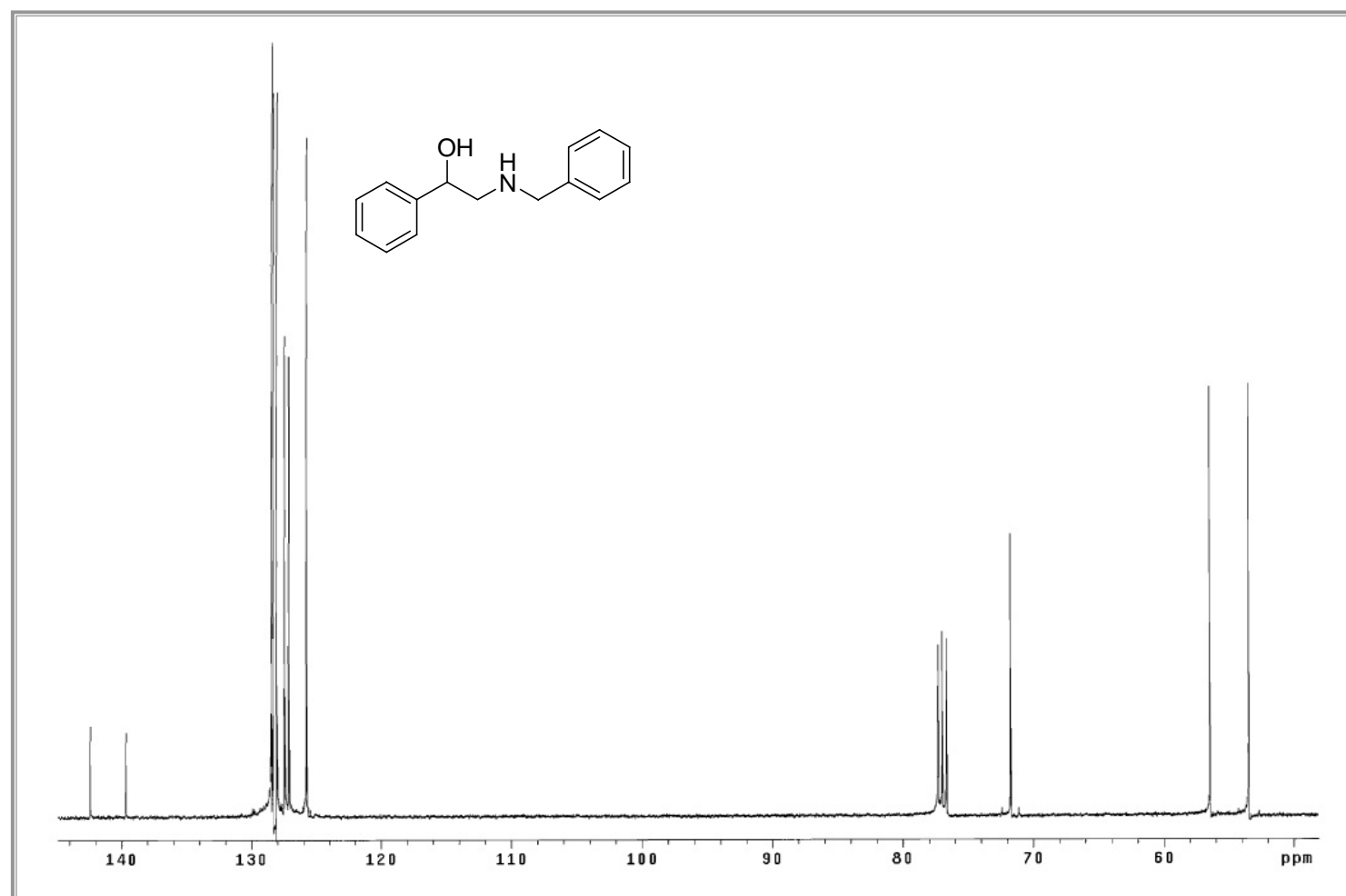
RMN de ^1H de 2-bencilamino-2-feniletanol (**18r**).



RMN de ^{13}C de 2-bencilamino-2-feniletanol (**18r**).



RMN de ^1H de 2-bencilamino-2-feniletanol (**19r**).



RMN de ^{13}C de 2-bencilamino-2-feniletanol (**19r**).